

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LAS PROPIEDADES ANTIBACTERIANAS DE
MATERIALES EMPLEADOS PARA REGENERACIÓN TISULAR

POR

MARIZA LARA LEMINI

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS CON ESPECIALIDAD EN PERIODONCIA

Junio, 2016

EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LAS PROPIEDADES ANTIBACTERIANAS
DE MATERIALES EMPLEADOS PARA REGENERACIÓN TISULAR

COMITÉ DE TESIS

DRA. IDALIA RODRÍGUEZ DELGADO

Director de Tesis

DRA. MA. DE LOS ÁNGELES ANDREA CARVAJAL

Co-Directora de Tesis

Vocal

AGRADECIMIENTOS

Al **Mtro. Jorge Augusto Albicker Rivero** director de la Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla cuando se realizó el trabajo de investigación, por permitirme utilizar las instalaciones de la universidad y por brindarme todas las facilidades para llevarlo a cabo.

Al **Dr. Jorge Antonio Yañez Santos** por su tiempo de asesoría microbiológica y apoyo para el uso del laboratorio de microbiología y sus materiales.

Al **Lic. Gustavo Israel Martínez González** por su valioso apoyo con la estadística de este trabajo y su disposición para asesorarme.

A la **Dra. Ma. de los Ángeles Andrea Carvajal Montes de Oca**, mi co-directora por haber sido un gran apoyo para la elaboración de esta tesis, por haberme brindado tanto de su valioso tiempo.

A la **Dra. Gloria Martínez Zambrano**, directora del Posgrado de Periodoncia por siempre brindarnos su apoyo como estudiantes y egresados.

A mi directora de tesis la **Dra. Idalia Rodríguez Delgado** por su asesoría en el desarrollo de este trabajo y compartir su enorme experiencia en este tipo de investigación .

A mis padres, mi hermano y Rodrigo por todo el apoyo moral y la paciencia.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS.....	iii
LISTA DE TABLAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPÓTESIS.....	3
3. OBJETIVOS.....	4
3.1 Objetivo general	
3.2 Objetivos Específicos	
4. ANTECEDENTES	5
4.1 Periodontitis Crónica	7
4.2 Regeneración tisular guiada.....	8
4.3 Regeneración ósea guiada	11
4.4 Membranas de colágeno.....	13
4.5 Contaminación de membranas.....	17
4.6 Terapia anti-infecciosa.....	23
4.7 Clorhexidina.....	25
4.8 Metronidazol.....	27
4.9 Streptococcus mutans	29
4.10 Streptococcus sanguinis.....	33
5. MARCO DE REFERENCIA.....	37

6. MÉTODOS.....	40
6.1. Muestras.....	40
6.2. Reconstitución de las bacterias	42
6.3. Preparación de las membranas para el estudio... ..	44
6.4 Siembra de las cajas de petri.....	45
6.5 Recolección de datos.....	46
6.6 Determinación del tamaño de la muestra.....	48
6.7 Método estadístico.....	49
7. RESULTADOS	50
7.1 Halos inhibitorios de las membranas con clorhexidina.....	50
7.2 Halos inhibitorios de las membranas con metronidazol.....	51
7.3 Análisis estadístico y gráficos.....	55
8. DISCUSIÓN.....	58
9. CONCLUSIONES	61
10. RECOMENDACIONES.....	62
LITERATURA CITADA.....	63
ANEXOS.....	73
RESUMEN BIOGRÁFICO	84

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Efecto de la membrana con clorhexidina in vitro con <i>S. mutans</i> a las 24hrs., 48 hrs y 7 días.....	49
2.	Efecto de la membrana con metronidazol in vitro con <i>S. mutans</i> a las 24 hrs, 48 hrs y 7 días.....	50
3.	Efecto de la membrana con clorhexidina in vitro con <i>S. sanguinis</i> a las 24 hrs, 48 hrs y 7 días.....	51
4.	Efecto de la membrana con metronidazol in vitro con <i>S. sanguinis</i> a las 24 hrs, 48 hrs y 7 días.....	52
5.	Estadística descriptiva del halo de inhibición bacteriana para <i>S. mutans</i> según el grupo de estudio y momento de la evaluación.....	54
6.	Estadística descriptiva del halo de inhibición bacteriana para <i>S. sanguinis</i> según el grupo de estudio y momento de la evaluación.....	55

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Preparación de cultivos.....	40
2. Bacterias ATCC.....	42
3. Reconstitución de bacterias.....	42
4. 4a. Membrana de colágeno.....	43
4b. Membrana con metronidazol	
4c. Membrana con clorhexidina	
5. Preparación de membranas.....	44
6. Rotulación de cajas.....	44
7. Ajuste del inóculo.....	45
8. Bacterias para la siembra.....	45
9. Caja sembrada y con membranas.....	46
10. Crecimiento bacteriano.....	46
11. Medición de halos inhibitorios.....	47

12. Medición halo inhibición clorhexidina- <i>S. mutans</i>	49
13. Medición halo inhibición metronidazol- <i>S. mutans</i>	49
14. Medición halo inhibición clorhexidina- <i>S. sanguinis</i>	51
15. Medición halo inhibición metronidazol- <i>S. sanguinis</i>	51
16. Evaluación y medición halo inhibitorio <i>S. mutans</i>	53
17. Evaluación y medición halo inhibitorio <i>S. sanguinis</i>	53
18. Gráfico 1. Media del halo de inhibición bacteriana para <i>S. mutans</i> según el grupo de estudio y momento de la evaluación.....	55
19. Gráfico 2. Media del halo de inhibición bacteriana para <i>S. sanguinis</i> según el grupo de estudio y momento de la evaluación.....	56

RESUMEN

La periodontitis es una enfermedad infecciosa que genera contornos irregulares en la cresta ósea y defectos infraóseos. La Regeneración Tisular Guiada (RTG) es un procedimiento quirúrgico que pretende regenerar los tejidos periodontales. Sin embargo, no siempre los resultados son satisfactorios, siendo la exposición y contaminación de las membranas un problema común.

Se han descrito protocolos de tratamientos anti-infecciosos como el uso de antibióticos sistémicos y locales, además se han desarrollado biomateriales para llevar al sitio de la regeneración algún antibiótico local. Entre estos materiales existen membranas con antimicrobianos para evitar la contaminación temprana.

El objetivo de este estudio fué evaluar el efecto antimicrobiano *in vitro* de dos membranas que han sido adicionadas con clorhexidina y metronidazol utilizando dos bacterias, *S. sanguinis* y *S. mutans*, que son bacterias involucradas en la formación temprana de la placa o biofilm. Se sembraron 20 cajas con cada una de las bacterias y se colocaron las membranas de clorhexidina, metronidazol y de colágeno (grupo control). Se midieron los halos de inhibición bacteriana de cada caja para cada membrana a las 24 y 48 horas y a los 7 días.

Se observó que las membranas si presentaban efecto antimicrobiano *in vitro* contra las bacterias utilizadas y que este efecto continúa por algunos días. No existieron diferencias estadísticamente significativas entre el halo de inhibición bacteriana de la clorhexidina y el metronidazol a las 24 horas ($p=0.3015$), 48 horas ($p=0.1814$) y 7 días ($p=0.5000$) cuando se hicieron las pruebas con *S. mutans*.

Se realizaron pruebas para *S. sanguinis*, y en éste caso si hubo diferencia estadísticamente significativa entre el halo de inhibición bacteriana de la clorhexidina y el metronidazol a las 24 horas ($p=0.0001$), 48 horas ($p=0.0001$) y 7 días ($p=0.0001$).

Por lo tanto se puede concluir que las membranas con clorhexidina o metronidazol pueden ser elegidas para un procedimiento de regeneración y pueden disminuir la contaminación.

Se recomienda realizar estudios *in vivo* para comprobar el efecto antimicrobiano y debe considerarse que las bacterias periodontales son las más dañinas, por lo tanto la elección del antimicrobiano que contenga la membrana también es de suma importancia.

ABSTRACT

Periodontitis is an infectious disease that causes bone loss and infraosseous defects. Guided Tissue Regeneration (GTR) is a surgical procedure that has the purpose to regenerate the lost periodontal tissues. However the outcome of the GTR is not always succesful. The most important issue in GTR procedures is membrane exposure and contamination.

Anti-infective protocols have been descrived to eliminate the risk of contamination in GTR procedures, like the use of systemic and local antibiotics. Besides research has been done to develop biomaterials that can serve as local antibiotic carriers at the site of the regeneration. Among these, there are membranes loaded with an antibiotic to prevent early bacterial accumulation.

The purpose of this study was to evaluate *in vitro* the antimicrobial effect of two membranes loaded with metronidazole and clorhexidine respectively. Using two common oral bacteria, *S. sanguinis* and *S. mutans* which are plaque precursors. Each bacteria was grown in 20 petri dishes and 6mm diameter of each membrane was placed in the petri dishes, antimicrobial effect was also evaluated at different times, 24 and 48 hours and at 7 days.

It was observed that the membranes loaded with antibiotics had an antimicrobial effect against *S. sanguinis* and *S. mutans in vitro*. The antimicrobial effect lasted a few days.

No statistically significant differences were found between the antimicrobial effect of clorhexidine and metronidazol agains *S.mutans* at 24 hours ($p=0.3015$), 48 hours ($p=0.1814$) and 7 days ($p=0.5000$). But there were statistical differences between the antimicrobial effect of clorhexidine and metronidazol when tested against *S. sanguinis*. 24 hours ($p=0.0001$), 48 hours ($p=0.0001$) y 7 days ($p=0.0001$).

In conclusion, membranes loaded with clorhexidine or metronidazole can be used for GTR procedures, they could decrease bacterial contamination.

Research needs to be done to evaluate the membranes *in vivo* and it must be considered that periodontal pathogens can be more harmful, therefore the election of the antimicrobial of the membrane is very important.

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad periodontal es una enfermedad infecciosa de los tejidos de soporte del diente que ocasiona pérdida de hueso y tejido que a su vez causa movilidad y hasta pérdida de los órganos dentarios.

En periodoncia, el desarrollo de las técnicas de regeneración tisular guiada y regeneración ósea guiada para recuperar tejidos perdidos o dañados, han incrementado las posibilidades de tratar defectos de hueso y mejorar las condiciones en boca.

La regeneración periodontal ha sido probada con el uso de distintos materiales de relleno, factores de crecimiento, membranas o barreras y una combinación de éstos.

La elección de los materiales a utilizar es de gran importancia, así como el manejo pre y post- operatorio del procedimiento.

Los procedimientos regenerativos para tratar lesiones periodontales ofrecen posibilidades increíbles; sin embargo frecuentemente fracasan debido a complicaciones infecciosas.

Para la prevención de fracasos debido a la infección, se debe tener mayor énfasis en la eliminación de patógenos tanto en el sitio de la regeneración como en el resto de la boca. Se han utilizado antibióticos sistémicos y locales. Se debe mantener una buena higiene, dar mantenimiento al paciente y seguir buscando dispositivos o materiales de regeneración de los cuáles se pueda obtener una protección antimicrobiana adicional.

Se logra encontrar la forma de reducir los riesgos de una infección en los sitios de regeneración, éstos procedimientos serán cada vez más predecibles. Se debe hacer uso de los materiales que puedan ayudar a disminuir los riesgos de infección como pueden ser las membranas con algún antimicrobiano.

La importancia de este trabajo radica en probar dos membranas de colágeno que han sido desarrolladas con metronidazol y clorhexidina y observar si es posible adquirir de ellas un efecto antimicrobiano que evite la temprana contaminación de las membranas de los sitios de regeneración.

2. HIPÓTESIS

Hi: Las membranas para regeneración periodontal que contienen metronidazol o clorhexidina presentan una inhibición bacteriana *in vitro* contra los microorganismos asociados a la formación temprana de placa o biofilm.

H0: Las membranas para regeneración tisular guiada que contienen metronidazol o clorhexidina no presentan una inhibición bacteriana *in vitro* contra los microorganismos asociados a la formación temprana de placa o biofilm.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Evaluar *in vitro*, las propiedades antibacterianas de dos membranas reabsorbibles con metronidazol y clorhexidina en contra de microorganismos asociados a la formación temprana de placa o biofilm en procedimientos de regeneración periodontal.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Medir la inhibición bacteriana *in vitro* de las membranas con metronidazol a las 24hrs, 48hrs y 7 días.

3.2.2 Analizar la inhibición bacteriana *in vitro* de las membranas con clorhexidina a las 24 hrs, 48hrs y 7 días.

3.2.3 Establecer si existe alguna diferencia entre éstas.

3.2.4 Comparar la inhibición bacteriana de las membranas con metronidazol o clorhexidina con las de colágeno puro.

4. ANTECEDENTES

La periodontitis es una enfermedad infecciosa que genera inflamación de los tejidos de soporte dental, pérdida de inserción progresiva y pérdida ósea, caracterizada por la formación de bolsas que pueden afectar un número variable de dientes y que muestra diferentes velocidades de progresión. La periodontitis se presenta con un amplio espectro de severidad clínica, y esta enfermedad compleja se produce por variaciones en la susceptibilidad del huésped así como variaciones en la composición y virulencia de la microflora oral.

Las bacterias son un prerrequisito para la aparición de la enfermedad periodontal. La inhabilidad de erradicar todos los microorganismos puede provocar la re-colonización bacteriana y evitar una buena cicatrización.

Las células epiteliales representan la mayor interfase del huésped para ser colonizada por bacterias. La interacción entre las células epiteliales gingivales y las bacterias determinan el éxito o fracaso de la colonización.

La placa bacteriana es una estructura no calcificada constituida por componentes salivares y numerosos géneros bacterianos en crecimiento continuo. El término “biopelícula” se usa para denotar una comunidad de bacterias envueltas en una masa extracelular polimérica que se acumula en una superficie. Las diferentes especies acumuladas en dicha estructura pueden proteger contra la colonización por patógenos exógenos o constituir el inicio, progresión y destrucción de las estructuras periodontales.

Las bacterias que de por sí están presentes en las superficies del diente proveen la base de la co-agregación por bacterias secundarias por lo que la adherencia temprana parece más importante que la secundaria. Es por esta razón que para la realización de este estudio se escogieron bacterias orales de colonización temprana como *S. mutans* y *S. sanguinis* para probar las membranas con clorhexidina y metronidazol.

Afortunadamente la enfermedad periodontal en la mayoría de las situaciones es tratable. Hay varias opciones de tratamiento, pero muy pocas pueden ser calificadas como regenerativas.

De acuerdo con la Academia Americana de Periodoncia, los procedimientos regenerativos incluyen injertos de tejido blando, injertos para reemplazo óseo, biomodificaciones radiculares, regeneración tisular guiada y combinaciones de estos para tratar defectos óseos, defectos de furca y recesiones.

Regeneración es definido como la reproducción o reconstrucción de una parte del cuerpo herida o perdida de tal forma que su arquitectura y función sean restauradas.

El objetivo de la regeneración periodontal es restaurar la función y estructura del periodonto (encía, hueso alveolar, cemento y ligamento periodontal).

Se ha probado realizar regeneración periodontal con autoinjertos intraorales y extraorales, aloinjertos, materiales aloplásticos, factores de crecimiento, membranas reabsorbibles y no reabsorbibles o una combinación de éstos.

El racional de la regeneración tisular guiada (RTG) está en utilizar una barrera física para guiar selectivamente la proliferación celular. La barrera previene la expansión del epitelio y el tejido conectivo y favorece la migración de células de ligamento periodontal y hueso alveolar en el defecto periodontal.

Las barreras también conocidas como membranas pueden ser reabsorbibles o no reabsorbibles. Las membranas no reabsorbibles están hechas por lo general de politetrafluoroetileno expandido (PTFE-e), mientras que las membranas reabsorbibles más utilizadas son de colágeno.

La ventaja de las membranas reabsorbibles sobre las no reabsorbibles es que no necesitan un segundo acto quirúrgico para removerlas, además de tener mayor biocompatibilidad con los tejidos.

Algunos problemas surgen cuando los defectos no son correctamente seleccionados o cuando las membranas tienden a exponerse y contaminarse. Las membranas no reabsorbibles son las que tienden a exponerse con mayor frecuencia. La contaminación bacteriana e infección resulta en una cicatrización retrasada y resultados pobres.

Para prevenir la infección de la herida, muchos investigadores han administrado antibióticos sistémicos a sus pacientes durante 2 o hasta 4 semanas post-operatorias. Sin embargo a pesar del uso de antibióticos sistémicos, se ha observado infección y formación de abscesos relacionados con la implantación de barreras.

Esto puede indicar que el antibiótico administrado no está dirigido en contra del microorganismo responsable de la infección o que la sustancia no alcanza la concentración suficiente para llegar al sitio infectado. Un mejor efecto podría lograrlo con el uso tópico de un antibiótico adecuado para que se alcance la concentración necesaria en el sitio de la membrana.

4.1 Periodontitis Crónica

La periodontitis es una enfermedad infecciosa crónica de los tejidos de sostén de los dientes. A causa de la infección bacteriana, los tejidos periodontales se inflaman y son destruidos lentamente por acción del proceso inflamatorio.

Es considerada una enfermedad compleja, se presenta la mayoría de las veces con un fenotipo relativamente leve, progresando lentamente y es crónica. Su aparición es tardía (adultos) y muy común.

El factor epidemiológico más importante en la enfermedad periodontal es la formación del biofilm y consecuente colonización bacteriana. Esta colonización bacteriana inicial es seguida de una colonización de bacterias periodontopatógenas que son las que van a contribuir a la destrucción de tejidos.

Los cambios en hueso que ocurren debido a la periodontitis son cruciales, ya que ellos provocan la pérdida dental. Los patrones de pérdida ósea pueden ser verticales u horizontales.

Para corregir las lesiones periodontales, se realizan cirugías para acceder a las raíces dañadas y a los defectos de hueso. Los procedimientos quirúrgicos periodontales incluyen gingivectomías, colgajos abiertos para debridado, cirugía ósea. Sin embargo, todos estos procedimientos ofrecen únicamente una nueva inserción lograda por la formación de un epitelio largo de unión y son procedimientos de tipo resectivo.

4.2 Regeneración Tisular Guiada

La periodoncia fue una de las ramas pioneras en odontología en búsqueda de recuperar aquellos tejidos perdidos por procesos patológicos y enfermedad periodontal.

La regeneración periodontal se define como la reconstitución de todos los tejidos que forman parte del aparato de inserción y soporte del diente. Estos tejidos son: hueso, ligamento periodontal, cemento y encía.

Los factores de crecimiento involucrados en reparación y regeneración, regulan varios procesos celulares claves como mitogénesis, quimiotaxis, diferenciación y metabolismo. Estos eventos son necesarios para la regeneración periodontal, ya que gracias a ellos se produce osteogénesis, cementogénesis y formación de tejido conectivo (Melcher, 1976).

Nyman y cols, en 1982 enfatizaron la importancia de las células del ligamento periodontal para la formación de nueva inserción y desarrollaron una técnica quirúrgica llamada Regeneración Tisular Guiada (RTG) para recuperar tejidos periodontales. En la RTG, una barrera es insertada entre la superficie radicular y los tejidos gingivales para impedir que las células epiteliales proliferen sobre la superficie radicular y se permita la formación y estabilización del coágulo para la cicatrización periodontal.

Nyman y cols. en 1982 llevaron a cabo el primer experimento en humano utilizando el procedimiento de RTG en el que hubo una ganancia de 7 mm.

Gottlow y cols. 1984, utilizaron membranas en defectos provocados en dientes de monos comparando dientes que fueron tratados sin membrana, encontrando que en el grupo experimental donde se aislaron las células del ligamento periodontal, hubo una ganancia mayor de nueva inserción.

Nyman 1987 fue el primer autor en describir los resultados del tratamiento de un diente humano bajo los principios de RTG utilizando una membrana.

Gottlow y cols. en 1986 describen una restitución predecible del aparato de inserción utilizando la técnica de RTG en 10 casos, cuyos resultados fueron variables en la cantidad de ganancia de inserción, algunos factores que influyeron en los resultados fue la recesión de tejido, la morfología del defecto y ligamento periodontal remanente. No se

observaron signos de anquilosis. Además determinaron que las únicas células que parecen tener la capacidad de formar una nueva inserción son las células del ligamento periodontal.

Pontoriero y cols. 1988 evaluaron el potencial de regeneración utilizando la técnica de RTG en furcas mandibulares grado II. En el 90% de los casos se mostró resolución del defecto de furca aplicado la técnica de RTG, comparado con un 20% de éxito cuando se utilizaba terapia convencional.

Varias investigaciones se han realizado para tratar de regenerar los defectos infraóseos provocados por enfermedad periodontal. Estos incluyen el uso de distintos materiales de relleno, regeneración tisular guiada, acondicionamiento de las raíces y factores de crecimiento (Crea, 2008).

Para lograr regeneración de los defectos infraóseos, los clínicos han intentado hacer colgajos por debridación, colgajo con injerto autólogo, alógeno o aloplástico a veces solos o en combinación con alguna membrana (Blumenthal, 1990).

La elección de una de estas dos alternativas va a depender de la morfología del defecto óseo. Un defecto con paredes óseas conservadas (defecto cerrado) puede cicatrizar con el simple uso de hueso autólogo, siempre que el mismo, conjuntamente con el coágulo de sangre permanezca estable dentro del espacio a regenerar.

En un defecto con ausencia de una o más paredes óseas (defecto abierto), la regeneración puede ser obstaculizada debido a factores como falta de espacio causado por el colapso de tejidos superficiales, o la inestabilidad del coágulo debido a micro-movimientos durante la fase de cicatrización. En estos casos la membrana además de cumplir con la función de barrera mecánica, cumple con la función de mantenedor de espacio, creando a nivel del defecto óseo un ambiente cerrado delimitado por un lado por las paredes óseas residuales y del otro lado por la membrana que sirve de pared provisional durante el período de cicatrización. Este ambiente debe ser espacioso y protegido, de manera que el coágulo sea estable en las primeras fases de cicatrización y de esta forma no se interrumpa el proceso de regeneración ósea. Cuando menor es el número de paredes óseas residuales, mayor será la necesidad de emplear biomateriales. Los defectos más profundos son considerados los mejores para regenerar, 5 mm o más de profundidad (Becker and Becker, 1999).

Sculean en 2008 realizó una revisión de estudios sistemáticos presentando información histológica utilizando membranas y material de regeneración. La mayoría de estudios ha demostrado mejor cicatrización histológica siguiendo una combinación de membrana y material de regeneración comparado con colgajo sólo (Mayfield, 1998).

Para mejorar los resultados de la regeneración, se han combinado las membranas con injertos óseos, colágeno impregnado de metronidazol, fibronectina y sulfato de heparán en colágeno, membranas con gel de colágeno como mantenedores de espacio o materiales osteoconductivos y osteoinductivos (Bunyaratavej y Wang, 1990).

Estudios tanto en animales como en humanos sobre el resultado de la cirugía periodontal regenerativa utilizando RTG han demostrado que la formación de nuevo cemento con inserción de fibras colágenas ocurre si la superficie radicular se ve poblada por células derivadas del ligamento periodontal (Nyman y cols., 1982). Para asegurar que esto suceda las células del epitelio y el tejido conectivo gingival deben quedar fuera de contacto con la superficie radicular mediante la colocación de una barrera física en forma de membrana. Al mismo tiempo, la membrana crea un espacio dentro del cuál se desarrollan las células del ligamento periodontal y se vuelve a poblar la raíz (Karring, 1993).

La cantidad de nueva inserción formada es variable, así como varios son los factores que pueden influir los resultados, entre ellos: la cantidad de soporte periodontal remanente, que involucra la cantidad de células progenitoras, recesión gingival o correcto cubrimiento de la membrana, la técnica aplicada y la contaminación bacteriana (Schmalz, 1997; Gottlow, 1993).

La cantidad del tejido regenerado también es limitado por el espacio debajo de la membrana y la morfología del defecto (Sculean, 2008).

La ganancia después de una regeneración tisular guiada puede variar entre 2 y 5 mm de inserción clínica (Ling, 2003).

La contaminación puede suceder durante el acto quirúrgico pero también en la etapa post-operatoria, después de la colocación de la membrana. Las bacterias de la cavidad oral pueden colonizar la parte coronal de la membrana y con frecuencia los márgenes gingivales se contraen permitiendo colonización de la membrana expuesta (Sander, 1994).

Sander y cols. en 1995 evaluaron la ganancia y formación de nueva inserción comparando raíces totalmente sumergidas con raíces no sumergidas. Los resultados indicaron una mayor ganancia y formación de nueva inserción en las raíces sumergidas, sugiriendo que una posible contaminación en las raíces no sumergidas fue causa de la menor cantidad de tejido regenerado.

La contaminación de membranas durante la cicatrización nos puede llevar a que el defecto óseo se cicatrice con tejido de granulación en lugar de hueso. Ya sea por morfología dental desfavorable, dehiscencia del colgajo, recesión gingival o incompleta aproximación de colgajos, la exposición de membrana es una complicación muy común durante la etapa de cicatrización después de una RTG. Hasta el 70% de las membranas colocadas pueden presentar exposición (Chen, 1997).

Se ha reportado que la exposición de la membrana reduce la ganancia de inserción clínica 75-100%(no expuesta) 30-59% (expuesta) (Ling, 2003).

4.3 Regeneración Ósea Guiada

Los defectos periodontales no son los únicos casos clínicos en los que la pérdida de tejidos condiciona el éxito de un tratamiento.

En la actualidad, los implantes dentales se han convertido en una alternativa predecible para tratar el edentulismo, siendo la disposición de hueso el mayor condicionante de este tratamiento.

En situaciones en las que el tejido óseo es insuficiente, se puede realizar un procedimiento que está basado en los principios de la RTG. Esto se puede hacer antes o en conjunto con la colocación de un implante (Koichi, 1998). Una variedad de técnicas y materiales se han utilizado para establecer la base estructural de tejido óseo para el soporte de implantes dentales.

Regeneración ósea guiada (ROG) es el nombre con el cuál se denomina a aquellos procedimientos quirúrgicos que se realizan con la intención de recuperar hueso alveolar atrofiado o mantener el ya existente en brechas edéntulas. Esto se logra mediante el uso de barreras aptas para evitar la infiltración, en la zona de reparación, de componentes

celulares (células epiteliales y conjuntivas) distintos a células osteopromotoras. Los primeros reportes científicos sobre ROG aparecen en la literatura a finales de la década de los años 50, donde se demostró crecimiento de nuevo hueso en fémur, cresta ilíaca y columna vertebral utilizando una barrera para impedir la invasión de tejidos blandos (Chen, 1997).

Piatelli en 1993 describe la colonización celular y formación ósea en defectos realizados en tibias de conejo y cubiertos con membranas de PTFE-e (politetrafluoroetileno expandido). A la tercera semana observaron células mesenquimatosas, tejido orgánico osteoide no mineralizado. A la sexta semana, pequeñas cantidades de hueso neoformado parecían alcanzar la superficie de la membrana. Incremento de material osteoide. A la novena semana había tejido óseo presente, por lo general proveniente de la parte más externa de la membrana y extendiéndose a la parte central. A la doceava semana se observó la cicatrización del hueso completa, hueso cortical maduro altamente mineralizado.

Para realizar una regeneración ósea guiada es necesario contar con los materiales que cumplan con los requisitos de 1. Biocompatibilidad, 2. Oclusividad, 3. Generación de espacio, 4. Integración a los tejidos y 5. Fácil manipulación. Además es necesario que permanezcan el tiempo suficiente para permitir la proliferación de los tejidos buscados (Hämmerle, 2003).

Las membranas usadas como barrera en ROG son de tipo no - reabsorbibles y reabsorbibles. Dentro del grupo de las reabsorbibles podemos citar las membranas de politetrafluoroetileno expandido (PTFE-e) y politetrafluoroetileno denso (PTFE-d) . Por otro lado también se pueden utilizar membranas reabsorbibles. Las membranas reabsorbibles pueden ser naturales o sintéticas (Sandenberg y cols., 1993).

Zitzmann y cols. en 1999 observaron que los resultados de la regeneración ósea guiada son similares ya sea utilizando una membrana de colágeno que una membrana de PTFE-e.

Las membranas, además de la función de barrera mecánica, cumple con la función de mantenedor de espacio, creando a nivel del defecto óseo un ambiente cerrado delimitado por un lado por las paredes óseas residuales y del otro lado por la membrana que sirve de pared provisional durante el período de cicatrización. Este ambiente debe ser

espacioso y protegido, de manera que el coágulo sea estable en las primeras fases de cicatrización y de esta forma no se interrumpa el proceso de regeneración ósea (Chung, 1997).

Mientras menor es el número de paredes óseas residuas, mayor será la necesidad de emplear biomateriales osteoinductivos. Los injertos de hueso autólogo representan la alternativa más adecuada para reparar defectos óseos complejos. Los biomateriales de relleno usados en ROG se clasifican en tres grupos: hueso autólogo, homólogo, heterólogo y materiales aloplásticos. Para la obtención de resultados satisfactorios en ROG es necesario tener en consideración los siguientes aspectos: uso de membranas apropiadas, procurar estabilización de la membrana con buena adaptación al hueso, creación de un espacio por debajo de la membrana, lograr que el colgajo cubra la membrana y mantener la membrana in situ por el tiempo necesario (Hämmerle, 2003).

4.4 Membranas de colágeno

El colágeno ha sido uno de los materiales más utilizados en medicina para la reparación de daños químico-mecánicos, ya sea en piel o mucosas, debido a su biocompatibilidad y su capacidad de promover la cicatrización de heridas.

Representa el 30% de las proteínas totales de los organismos. En los tejidos humanos se encuentran hasta 16 tipos de colágeno, siendo los más abundantes y por lo tanto los más estudiados los de tipo I presentes en hueso, tipo II presente en cartílago hialino y tipo III presentes en piel (Bernales, 2004).

Desde principios de la década de los años 80's, se han investigado diversos biomateriales que han ampliado el espectro de posibilidades a la hora de tratar una lesión periodontal.

El material más utilizado para la confección de barreras no reabsorbibles para procedimientos de RTG y ROG, ha sido el politetrafluoroetileno expandido y se han conseguido resultados satisfactorios.

El colágeno tipo I es un componente predominante en el tejido conectivo periodontal y se han desarrollado varias membranas comerciales utilizando a éste como su principal componente. Los materiales de colágeno también poseen ventajas como hemostasia, quimiotaxis para los fibroblastos del ligamento periodontal y para los fibroblastos gingivales, poca reacción inmunológica, fácil manipulación, habilidad para aumentar el volumen o grosor del tejido.

Algunos autores recomiendan el uso de membranas reabsorbibles, argumentando la obtención de resultados similares sin requerir una segunda cirugía para la remoción (Bunyaratajev and Wang, 2001).

Las membranas reabsorbibles son construidas con materiales biocompatibles que no interfieren con los procesos de cicatrización. En estas membranas se lleva a cabo un proceso de reabsorción por hidrólisis y los productos de degradación son absorbidos por los tejidos, siendo metabolizadas en agua y anhídrido carbónico, por lo que no requieren una segunda intervención para ser removidas. encontraron que la regeneración ósea con las membranas reabsorbibles tiene lugar más precozmente que con las membranas PTFE-e, lo que puede deberse a una mayor estimulación de la osteogénesis o a la liberación de factores de crecimiento por parte de las células inflamatorias que se pueden evidenciar alrededor de las membranas reabsorbibles (Sandenberg y cols., 1993).

Gotfredsen y cols. en 1994 demostraron que las membranas constituidas de poliésteres hidrolizables dan lugar a una reacción inflamatoria durante el proceso de biodegradación asociada a una reacción de cuerpo extraño.

Materiales sintéticos como el ácido poliláctico entre otros también son utilizados para confección de membranas reabsorbibles (Magnusson, 1988). Sin embargo, dentro de las membranas reabsorbibles existentes, son las membranas de colágeno las que reportan mejores resultados (Bunyaratev and Wang, 2001).

La mayoría de las membranas de colágeno se obtienen de tejido cadavérico de humano o de animal.

Las membranas que se utilizan tanto para RTG como para ROG deben cumplir con requisitos como:

- a) biocompatibilidad, b) oclusividad celular, c) generación de espacio, d) integración a los tejidos y e) fácil manipulación. Además es necesario que permanezcan el

tiempo suficiente como para permitir la proliferación de los tejidos buscados (Hardwick, 1995).

La desventaja de las membranas de colágeno en ROG es que a veces no soportan la presión de los tejidos durante la cicatrización. La herida se colapsa y no se logran buenos resultados. Por lo tanto se debe contemplar la colocación de un injerto en combinación con la membrana (Blumenthal, 1990).

En los últimos años, las membranas reabsorbibles han demostrado que pueden promover la regeneración ósea en los defectos perimplantares (Lundgren, 1994). En diversos estudios se han presentado controversias en relación al uso de membranas reabsorbibles y no reabsorbibles en defectos perimplantares como dehiscencias y fenestraciones, evidenciándose la capacidad regenerativa de las membranas reabsorbibles unidas a injertos de hueso autólogo (Gottlow y cols., 1994).

Elharar y cols. en 1998 evaluaron y compararon los resultados de tres membranas para RTG, observaron que las membranas de colágeno y las de PTFE-e promueven una ganancia similar en niveles de inserción. La cicatrización se observó sin complicaciones, sin embargo si hubo menor recesión con las membranas de colágeno que con las membranas de PTFE. Entre los materiales reabsorbibles, el colágeno es muy compatible y tiene buena influencia en el desarrollo celular.

Las membranas no reabsorbibles deben utilizarse cuando se requiere mayor estabilidad de la membrana, lo que resulta en una mayor ganancia en volumen y altura ósea (Koichi, 1998).

Mac Donald y cols. en 1998 valoraron los aspectos clínicos y microbiológicos de membranas reabsorbibles y no reabsorbibles, encontraron resultados similares en ambas. Las membranas pueden ser un nicho ecológico para el crecimiento bacteriano y comprometer resultados de la regeneración.

Laurell y cols. en 1994 utilizaron barreras reabsorbibles para procedimientos de RTG. Demostraron que el uso de las membranas reabsorbibles pueden reducir la profundidad de sondeo, aumentar la ganancia de inserción clínica y además presenta baja incidencia de patología gingival, recesión gingival y exposición de membrana. Los resultados son comparables con los que se logran en RTG utilizando barreras no

reabsorbibles. Y ya que la membrana reabsorbible es de un solo procedimiento, es más biológica, psicológica y económicamente aceptable.

Los materiales de colágeno han sido muy útiles en medicina y odontología debido a su biocompatibilidad y su capacidad para promover la cicatrización. Sus resultados para RTG, ROG y cubrimiento radicular son comparables con otras membranas no reabsorbibles. Pueden utilizarse con o sin injerto óseo.

Se ha evaluado el grado de compatibilidad entre una membrana de colágeno y una de politetrafluoroetileno expandido (PTFE-e). La membrana de PTFE-e inhibía la síntesis de ADN del fibroblasto gingival, mientras la de colágeno mejoraba la proliferación celular. La PTFE-e provocaba una disminución en la síntesis de colágeno extracelular y glucosaminoglucano, los mayores componentes de la matriz extracelular que juegan un papel importante en la cicatrización.

Para prolongar la absorción de las membranas se han desarrollado varias técnicas de entrelazado de colágeno, entre más elevado el grado de entrelazado o reticulación es más lenta la degradación de la membrana.

Por lo general el tiempo en el que una membrana de colágeno permanece intacta es suficiente para prevenir la migración apical epitelial durante la cicatrización periodontal temprana, ya que el tiempo crítico de proliferación epitelial ocurre en los primeros 14 días.

La membrana colágena disminuye la actividad mitótica de células basales que resulta en un apilamiento de células dividiéndose adyacentes a las membranas inhibiendo la migración del epitelio.

También se ha agregado sulfato de heparán y fibronectina para mejorar el efecto inhibitorio de migración epitelial.

Una vez que el epitelio está maduro la integridad de la membrana ya no es esencial para la regeneración tisular, sino en la cicatrización temprana cuando el epitelio migra activamente sobre la raíz.

Las membranas colágenas se han utilizado para aumento de tejido óseo previo o en conjunto a la colocación de un implante. Aunque su rápida reabsorción preocupa. Los materiales de relleno mejoran las condiciones de la ROG. Son mejores que las no

reabsorbibles en cuanto a la cicatrización, una menor incidencia de dehiscencia, exposición y la remoción prematura de la membrana (Hämmerle and Lung, 2003).

El proceso de reabsorción de las membranas se asocia a una respuesta de los tejidos circundantes así que este proceso debe ser controlado para que el diseño de la membrana se mantenga durante la fase inicial del periodo de cicatrización (Gottlow, 1993).

4.5 Contaminación de membranas

A pesar de que los tratamientos regenerativos ofrecen excelentes posibilidades para el tratamiento de lesiones periodontales, es muy común que fracasen o no se logre el resultado esperado debido a complicaciones infecciosas.

Existe un acuerdo en que los factores etiológicos de mayor importancia en la enfermedad periodontal son de origen microbiano.

Detener la enfermedad periodontal, así como la reparación y regeneración de defectos periodontales necesitan la eliminación o por lo menos la reducción significativa de estos microorganismos (Mombelli y cols., 1993).

Complicaciones infecciosas, incluyendo dolor, supuración, inflamación, necrosis tisular ocurren con más frecuencia en presencia de membranas que en un colgajo convencional. Durante la cicatrización, la parte coronal de la membrana frecuentemente se expone, provocando la presencia de un espacio lateral a la membrana que puede ser el sitio de la colonización bacteriana (Zitzmann and Sharer, 1999).

Las membranas para RTG y ROG expuestas proveen un ambiente ideal para la adherencia de bacterias y su multiplicación, también es una entrada para los patógenos destructores de tejidos (Chen y cols, 2003).

Al haber exposición, se produce la formación de un espacio entre la superficie externa de la membrana y el tejido gingival, debido a la migración apical del epitelio de la superficie interna del tejido gingival de recubrimiento, lo que permite que las bacterias colonicen el área subgingival (Chang, 2000).

La importancia del control de la infección en tratamientos regenerativos ha llevado a considerar recomendaciones terapéuticas específicas.

Los problemas relacionados con infección pueden deberse a factores pre-quirúrgicos, en el momento de la cirugía, inmediatamente después de la cirugía, durante el periodo de cicatrización, en segundas fases o en el periodo de mantenimiento.

Previo a la cirugía debe considerarse el raspado y alisado radicular, instrucciones de higiene al paciente y áreas adyacentes como fuente de contaminación (Newman, 1993).

Nowsari y Slots en 1994 examinaron la microflora en 11 membranas alrededor de defectos de furca y en 16 alrededor de implantes que fueron retiradas entre 4 – 6 semanas después de su colocación. Identificaron organismos periodontopatógenos, estreptococos beta hemolíticos, estafilococos, enterobacterias y *Candida*. Encontraron una relación inversa entre el conteo microbiano y la ganancia en los niveles de inserción. Los microorganismos probablemente se originaron de lesiones residuales o provienen de lesiones periodontales adyacentes, por lo que la eliminación de microorganismos previo a la colocación de una membrana es crítico.

Antes de colocar un material de regeneración se debe realizar una correcta eliminación de los patógenos. El control de infecciones es particularmente importante cuando se utilizan membranas ya que pueden inducir una reacción a un cuerpo extraño y mermar la respuesta del huésped.

De Sanctis y cols. en 1996 evaluaron la relación entre la colonización bacteriana en membranas de PTFE-e y el resultado final de la regeneración. Determinaron que la cantidad de tejido regenerado se ve influenciado por la contaminación de las membranas.

Observaron al microscopio membranas retiradas a las 4 y 6 semanas de colocación, encontraron en el área del collar de la membrana cocos y bacilos cortos, mientras en zonas más apicales encontraron filamentos y bacilos cortos y largos y además espiroquetas.

A pesar del régimen de control de placa, revisiones para profilaxis, 14 días de antibioticoterapia y colutorios con clorhexidina, la mayor parte de las membranas mostraron presencia microbiana.

Un mejor efecto antimicrobiano podría obtenerse con la aplicación local de un antibiótico adecuado.

Las bacterias orales colonizan las membranas, las diferentes especies tienen capacidad variable para colonizarlas. *Streptococcus mutans* presenta una gran adherencia a todas las membranas (Hung, 2002).

Se han identificado cocos, filamentos y bacilos cortos por dentro y fuera de membranas extraídas, por ejemplo, Temprow y Nalbandian en 1993 recolectaron mayor cantidad de estreptococos y actinomicetes.

Asman y Wijkander en 1995 evaluaron la degradación de colágeno en un modelo experimental en ratas, comprobando que la inyección de bacterias en tejido de granulación incrementa la degradación de colágeno. La liberación de enzimas proteolíticas de polimorfonucleares y monocitos puede incrementar la degradación de colágeno, sin embargo también puede depender del efecto directo de la bacteria sobre el colágeno.

Hay bacterias específicas que están particularmente relacionadas con el fracaso de la regeneración periodontal, la *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus*, *Peptostreptococcus micros*, *Capnocytophaga*. Sin embargo estas bacterias orales no existen como entidades independientes pero si funcionan como una comunidad coordinada, organizada en espacio y metabólicamente integrada (Marsh, 2005).

También se ha relacionado una menor ganancia en regeneración debido a la colonización bacteriana a la hora de manipular la membrana. Estas bacterias pueden provenir de la misma saliva, del debridamiento insuficiente de la zona infectada o hasta del dorso de la lengua.

Nowzari y cols. en 1996 demostraron la importancia de controlar los patógenos microbiológicos en regeneración tisular guiada. La infección representa un obstáculo para la formación de nueva inserción y para la formación ósea. Encontraron que en pacientes que tomaron antibiótico post-operatorio había mayor ganancia en los niveles de inserción que aquellos paciente que no se les prescribió ningún antibiótico.

De Sanctis y cols. en 1996 mencionan que en la etapa temprana de la cicatrización de una regeneración tisular guiada, puede haber recesión del colgajo y dejar expuesta la membrana, la cuál queda susceptible a la contaminación de los microorganismos.

Evaluaron la relación entre la colonización bacteriana de la parte interna de la membrana de PTFE-e y la ganancia clínica de niveles de inserción. Encontraron mayor colonización en el collar de las membranas que en las zonas más internas. En las membranas que estaban colonizadas en su parte media los resultados fueron menos satisfactorios. Aún con tratamiento de antibiótico y estricto control de higiene la mayoría de las membranas mostraron colonización bacteriana. Un mejor efecto antimicrobiano puede lograrse con la aplicación tópica de un antibiótico que provea adecuada concentración en la zona.

Zucchelli y cols. en 1999 compararon la colonización temprana en 3 distintas membranas. La acumulación bacteriana entre los materiales difiere en cantidad pero no en calidad de la flora.

La mayoría de los microorganismos se adhieren a superficies y forman biofilms, que son altamente estructurados y organizados. Compuestos de microorganismos interactivos o comunidades. La expresión genómica microbiana se altera en los biofilms; los organismos se comunican mediante transferencia de genes y secreción de moléculas de señalización. Las células en biofilms son menos susceptibles a agentes microbianos. La placa dental es un biofilm, por lo que se puede encontrar susceptibilidad reducida a agentes antimicrobianos y sinergismo patogénico.

La microflora subgingival es muy diversa hasta en salud. Los complejos bacterianos están relacionados ya sea con enfermedad o salud (Marsh, 2005).

La contaminación temprana mediada por una película involucra morfotipos de cocos. La maduración de la placa sobre la membrana involucra la multiplicación de los cocos y el cambio subsecuente hacia una placa formada por bacilos y filamentos.

La pronta acumulación de placa sobre las membranas evitan la organización de fibrina sobre la membrana y reduce su integración con el tejido conectivo (Zucchelli y cols., 1999).

Yoshinari y cols. en 1998 determinaron los tipos de células inflamatorias y contaminación bacteriana en membranas de PTFE-e retiradas a las 4 a 6 semanas. Dividieron las membranas en cervical, medio y apical y en externa, central e interna. Tanto las bacterias como las células iban disminuyendo apicalmente. Se encontraron en su mayoría bacterias gram positivas en parte externa e interna en cantidades similares. Se

encontró una correlación negativa entre la ganancia de niveles de inserción y la cantidad de bacterias.

Chen y cols. en 1997 compararon el rango en el cuál 11 bacterias orales comunes colonizan 3 distintas membranas. Se supendió la higiene oral por 1, 3, 7 y 14 días. Todas las especies estaban presentes y no había diferencia en número en las tres membranas.

Nowdari y cols. en 1996 observaron la colonización bacteriana de una membrana a los 3 minutos de manipulación oral, se encontraron bacterias en 16.7% de las membranas. Las membranas que presentaban microorganismos específicos a los 3 minutos, tienden a presentar las mismas especies a las 6 semanas, sugiriendo la supervivencia a largo plazo de las bacterias. Algunas residiendo en poros de la misma membrana.

Tempro y cols. en 1996 analizaron colonización de membranas que fueron retiradas a las 4 y 6 semanas de su colocación, encontrando placa en la parte de la membrana expuesta, se encontraron predominantemente especies de estreptococos en las partes oclusivas. Determinaron que las bacterias en un inicio colonizan la porción expuesta y posteriormente van creciendo hacia la porción no expuesta.

Aunque la exposición de la membrana es importante para que las bacterias tengan acceso a la membrana, una membrana que permanece cubierta durante el tiempo de retención también puede ser accesible para las bacterias mediante la herida.

Wang y cols. en 1994 compararon la adherencia bacteriana temprana en tres membranas. La adherencia de bacteria a tejidos y biomateriales ha sido reconocida como parte inicial fundamental en la patogenia de las infecciones. La observación cualitativa de este estudio demostró que los microbios examinados *S. mutans*, *S. sanguis*, *A. viscosus*, *P. melaninogenica* y *Selemona sputigena* pueden colonizar los biomateriales a los 3 días. Las bacterias que de por sí están presentes en las superficies del diente proveen la base de la co-agregación por bacterias secundarias por lo que la adherencia temprana parece más importante que la secundaria. Éstas bacterias que tienen habilidad para adherirse, secretan sustancias de glicocálix, un factor de virulencia y una vez que las bacterias están protegidas por este glicocálix, son resistentes a antibióticos y antimicrobianos.

La respuesta de los tejidos en procedimientos de RTG en presencia de placa dento-bacteriana responde con una actividad osteoclástica, lo cuál significa destrucción ósea y se compromete el resultado del procedimiento (Ling y cols., 1994).

Simion y cols. en 1994 evaluaron la permeabilidad de las membranas de PTFE-e expuestas a medio oral. Encontraron que la oclusividad de la membrana puede retrasar la contaminación bacteriana pero a la tercera o cuarta semana ya hay permeabilidad para las bacterias, por lo tanto si la membrana se encuentra expuesta es recomendable retirarla en esta semana. Observaron que a la cuarta semana todas las membranas presentaban una capa amarillenta gruesa de placa bacteriana.

La actividad colagenasa de *P. gingivalis* demuestra que esta bacteria puede degradar por completo una membrana en 4 o 5 días. Ricci y cols. en 1996 demostraron que *P. gingivalis* puede pasar libremente a través de una membrana reabsorbible a las 6 horas, a las 48 horas se observa crecimiento en cualquier membrana.

Selvig y cols. en 1992 y Machtei y cols. en 1994 sugirieron que el número o cantidad de bacterias encontradas en una membrana puede predecir el resultado de la regeneración.

P. gingivalis y *T. denticola* poseen actividades proteolíticas, asociadas con propiedades patogénicas relacionadas con la destrucción de tejido conectivo periodontal, interrupción de los mecanismos de defensa del huésped y mantenimiento de la respuesta inflamatoria de los tejidos (Sela y cols., 2003).

Ling y cols. en 2003 evaluaron aspectos clínicos y microbiológicos de membranas expuestas. Observó que en un 26.3% de las membranas expuestas no había ganancia de inserción. En las membranas expuestas además de menor inserción también se observó recesión del tejido. Microbiológicamente se observó que las membranas expuestas contenían más *A. actinomycetemcomitans* que las no expuestas.

Nowsari y cols. en 1995 determinaron la composición microbiana de las partes apicales de membranas de PTFE-e tanto en las superficies que tienen contacto con la encía como en las superficies que dan la cara hacia el diente.

Los patógenos que se encontraban en la superficie que da la cara al diente parecen ser determinantes en los resultados de la regeneración.

La habilidad de los periodonto-patógenos de producir componentes citotóxicos e inflamación gingival inhiben la migración coronal de los fibroblastos en la superficie radicular.

4.6 Terapia anti-infecciosa

Por lo regular, en procedimientos de RTG, se prescriben antibióticos sistémicos como parte del protocolo quirúrgico para evitar la formación de micro-abscesos que pueden ocurrir alrededor de la tercera semana de cicatrización, así como para evitar contaminación de la membrana en caso de exposición (Markman y cols., 1995).

La mayoría de medicamentos se pueden administrar por varias rutas, definidas como locales y sistémicas, la elección depende de factores relacionados con el paciente y el medicamento.

Los medicamentos administrados vía sistémica se absorben al flujo sanguíneo y se distribuyen mediante la circulación. La desventaja de la terapia sistémica incluye: mayor riesgo de toxicidad, adquisición de resistencia bacteriana, interacciones medicamentosas e incumplimiento por parte del paciente.

Las ventajas de la administración local incluyen: limitar o reducir los efectos adversos de la administración sistémica, mayor concentración del medicamento en el sitio deseado.

Las desventajas son: dificultad de penetración en zonas difíciles de alcanzar, la misma posibilidad de desarrollar resistencia y en algunas situaciones dificultad para obtener la concentración necesaria (Somayaji y cols, 1998).

Un punto crítico de la cicatrización de RTG es la protección del coágulo. Los productos derivados del metabolismo de bacterias pueden disrumpir el coágulo en etapas tempranas de la cicatrización. Para prevenir la infección de la herida se han prescrito antibióticos sistémicos por una o dos semanas. Otros autores manejan antimicrobianos orales además de los sistémicos.

Sin embargo se ha demostrado que ninguna terapia previene de forma definitiva la colonización bacteriana de las membranas reabsorbibles y no reabsorbibles.

Significando que el medicamento no es el indicado contra los microorganismos responsables o el medicamento no alcanza las concentraciones suficientes para inhibirlos (Zucchelli y col., 1999).

Se han realizado estudios investigando la eficacia de ciertos medicamentos tópicos que se puedan utilizar de diversas maneras para evitar la contaminación de las membranas en procedimientos de RTG.

Los antibióticos se pueden liberar de forma tópica con diversos vehículos. Se pueden administrar diariamente por medio de irrigación, acondicionando las estructurales dentales, en enjuagues y vehículos de lenta liberación, éstos parecen ser los más adecuados y efectivos (Markman y cols., 1995).

Existen estudios que han demostrado una mejoría en los resultados cuando se aplica de manera local un antibiótico en los sitios de regeneración.

Sanders y cols. y Frandsen y cols. en 1994 utilizaron gel de metronidazol para aplicación local en sitios donde se llevaron a cabo procedimientos de RTG, en ambos estudios se encontraron mejores resultados en cuanto a ganancia en niveles de inserción en los sitios donde se había aplicado el metronidazol tópico.

4.7 Clorhexidina

La clorhexidina es un agente que ha sido utilizado en odontología por décadas para el control de placa. Su efecto clínico así como sus efectos secundarios son muy bien conocidos.

Es una bisguanida catiónica con actividad antibacterial amplia, muy baja toxicidad y una fuerte afinidad a unirse a mucosa y piel.

Actúa dañando la membrana citoplasmática de la bacteria. La bacteria está cargada negativamente, la molécula de clorhexidina es atraída por la superficie de la bacteria con adsorción específica a los componentes con fosfato, lo que altera la

integridad de la membrana bacteriana y la clorhexidina es atraída a la membrana interna, se une a los fosfolípidos incrementando la permeabilidad (Jones y cols, 1997).

La clorhexidina tiene actividad antibacteriana en contra de varios organismos gram positivos y gram negativos así como levaduras. Inhibe producción de ácido por la placa, evita la actividad de la fosfo enol piruvato fosfotransferasa en estreptos, inhibe la toma de arginina y catabolismo en *S. sanguis* e inhibe proteolisis de *P. gingivalis* (Chen y cols., 2003).

Tiene propiedades como la sustantividad bacteriana y biocompatibilidad (Lin y cols., 2006).

La clorhexidina tiene rápida acción, un enjuague de un minuto con clorhexidina al 0.12% puede reducir en un 67.9% la cantidad de microorganismos recolectados en un biofilm. Se ha demostrado que si se utiliza como un antiséptico previo a una cirugía puede reducir la cantidad de algunos estreptococos (de Albuquerque y cols., 2004).

Se han desarrollado diversos vehículos para llevar la clorhexidina a los sitios de interés. Podemos encontrar la clorhexidina en spray, solución, gel, barniz y en este caso añadida a una membrana de colágeno.

Cosyn y cols. en 2005 compararon el efecto de barnices de clorhexidina demostrando el efecto antiplaca cuando se utilizan. Se ha demostrado que la aplicación de barnices de clorhexidina suprime la cantidad de *S. mutans*, disminuyendo el potencial cariogénico y que también los periodontopatógenos son bacterias sensibles a la clorhexidina.

Una estrategia anti-infecciosa incluye el uso de clorhexidina antes e inmediatamente después de la cirugía. Colutorios de clorhexidina antes del alisado y raspado radicular puede reducir significativamente la carga bacteriana y el potencial de infección (Newman y cols., 1993).

Los enjuagues de clorhexidina al 0.12% pueden ser benéficos en procedimientos de RTG, controlando la colonización bacteriana inicial de la membrana (Tempro y cols., 1993).

Si la adherencia de bacterias a superficies orales representa un paso crítico en el inicio de un proceso patológico, un factor que reduzca o limite la adherencia bacteriana será benéfica.

El tratamiento de *S. mutans* con clorhexidina reduce significativamente la adherencia de la bacteria a superficies de hidroxiapatita. También afecta la coagregación de bacterias orales (Grenier, 1996).

Grenier y cols. en 1996 evaluaron el efecto de la clorhexidina en la adherencia de las *P. gingivalis* a células epiteliales y eritrocitos. La clorhexidina inhibía la adherencia de *P.gingivalis* a células huésped, alterando la conformación estructural de la membrana exterior.

Se ha demostrado que el digluconato de clorhexidina al 0.05% es tóxico para microorganismos pero también para los queratocitos humanos en piel. Estudios han demostrado que la clorhexidina es citotóxica para células epiteliales gingivales y fibroblastos después de incubarlos directamente con clorhexidina. Sin embargo, en raíces tratadas con clorhexidina al 0.12% no se ha observado inhibición de adherencia celular (Chen y cols. 2003).

Existe también la controversia asociada con el uso de la clorhexidina inmediatamente después de la cirugía. Algunos dicen que podría perturbar la formación del coágulo y afectar desarrollo de células epiteliales y conectivas (Newman y cols., 1993).

Mariotti y Rumpf. en 1999 describieron que la proliferación celular fue dependiente de la concentración de la clorhexidina soluble, pero independiente de la exposición a ésta. Una variedad de concentraciones han demostrado diversos efectos. Las características tóxicas no son sólo para bacterias, también para PMN, macrófagos, eritrocitos, fibroblastos, por lo que la aplicación directa en herida puede retrasar la cicatrización. La concentración de 0.20% de clorhexidina por 30 segundos causa muerte significativa e inhibición de la incorporación de aminoácidos en fibroblastos nuevos. La clorhexidina es tóxica en tejido conectivo periodontal en concentraciones menores que las que se utilizan para control de placa.

Es por ello que la introducción de clorhexidina a células del tejido conectivo o periodontal durante regeneración, procedimientos quirúrgicos o terapia periodontal inicial puede tener consecuencias en la cicatrización.

4.8 Metronidazol

El metronidazol es un agente antimicrobiano con éxito reportado para tratar infecciones periodontales (López y cols., 1998).

Del grupo de los nitroimidazoles, que son específicamente anti-anaeróbicos por naturaleza, inhibe la síntesis del ácido nucléico. Se absorbe bien del tracto gastrointestinal y se pueden detectar niveles bactericidas en sangre y saliva después de una hora de la ingesta. Se excreta por riñón.

Está contraindicado en pacientes con lesión en el sistema nervioso central, pacientes con discrasia sanguínea aguda, pacientes con defectos cardiacos o con prótesis valvular y en pacientes embarazadas. Interactúa con disulfiram, alcohol, warfarina, hidantoína, antidepresivos.

Actúa contra anaerobios sin afectar a la flora bacteriana aerobia y rara vez se presenta resistencia al medicamento (Mitchell, 1984).

El metronidazol tiene un espectro de actividad contra anaerobios incluidos los de la placa subgingival. Niveles en suero y líquido crevicular demuestran alcanzar el potencial mínimo inhibitorio para la mayoría de los periodontopatógenos (Kurtis y cols., 2002).

Las espiroquetas *in vitro* son sensibles a 0.1 microgramos por mililitro de metronidazol, niveles que se alcanzan en líquido crevicular con la ingesta de 250 mg de metronidazol tres veces al día (Loesche y cols., 1993). Sin embargo el metronidazol tanto tópico como sistémico puede no matar estreptococos beta hemolíticos y otros patógenos aerobios facultativos (Nowsari and Slots, 1994).

Mestnik y cols. en 2010 evaluaron los resultados clínicos y microbiológicos del uso de metronidazol y amoxicilina en pacientes con periodontitis agresiva. La mezcla de estos dos antibióticos mejoró la respuesta al tratamiento periodontal en estos pacientes. Se observó una disminución en la colonización de *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsitia*, *P. gingivalis* y *T. denticola*.

El metronidazol es un fuerte bactericida que actúa contra las bacterias anaerobias estrictas inhibiendo réplica y transcripción del ADN bacteriano. Su administración sistémica mejora los parámetros clínicos en enfermedad periodontal.

La administración sistémica de metronidazol con amoxicilina en periodontitis crónica moderada a avanzada como único tratamiento disminuyó el sangrado en sitios activos. Si se combina con Amoxicilina tiene un efecto sinérgico y soluciona el problema del metronidazol que tiene poco efecto en infecciones que no predominan los anaerobios (López y cols., 1998).

Somayaji y cols. en 1998 compararon el efecto entre tetraciclina y metronidazol para reducir microorganismos subgingivales en bolsas periodontales. La tetraciclina se liberaba más rápido, sin embargo el metronidazol requería menos concentración para ser efectivo.

Sander y cols. en 1994 evaluaron la cicatrización periodontal post-operatoria en RTG asociada a la aplicación tópica del gel de metronidazol. Se realizaron cirugías de RTG y se aplicó aproximadamente 1 gr de gel de metronidazol por abajo y encima de la membrana y sobre el margen del colgajo, los sitios control no recibieron gel. Se observó a los seis meses de regeneración mejores niveles de inserción en sitios donde se aplicó metronidazol en gel.

Frandsen y cols. en 1994 evaluaron los hallazgos clínicos y microbiológicos de la aplicación en gel de metronidazol al 25% en procedimientos de RTG. Encontraron mejores resultados en el grupo en el que se aplicó el gel. Aunque el metronidazol sólo tuvo efecto la primera semana, los resultados demuestran que los niveles de inserción fueron mejores en este grupo. La colonización de la membrana fue retrasada por el gel pero no fue evitada por completo.

Zucchelli y cols. en 1999 evaluaron el efecto de una aplicación tópica de antibiótico. Al grupo experimental se aplicó metronidazol en gel al 25%. Concluyeron que la administración tópica de antibiótico es más efectiva que la sistémica en cuanto a la prevención de la contaminación de la membrana, pero no mejora los resultados clínicos por una interferencia del vehículo (gel) con los tejidos gingivales que puede reducir el potencial benéfico. Es probable que la presencia de gel sobre la membrana, debido a sus características físicas pueda comprometer la integración entre la membrana y el colgajo y

de esa forma afectar el proceso de regeneración. Sin embargo los resultados sugieren que la aplicación local de antibióticos es preferible sobre la sistémica, ya que se necesita una menor dosis.

4.9 Streptococcus mutans

Clasificación:

Reino: Bacteria

Filo: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Lactobacillales

Familia: Streptococcaceae

Especie: *Streptococcus mutans*

Descripción y significado:

Streptococcus mutans es una bacteria Gram-positiva que vive en medio oral. Puede desarrollarse en temperaturas que varían desde 18 a 44 grados centígrados. Metaboliza distintos carbohidratos, creando un medio ambiente ácido en la boca, como resultado de este proceso. Este ambiente ácido en boca ocasiona la caries dental. Este microorganismo es la principal causa de presencia y desarrollo de caries en el mundo.

El *S. mutans* está compuesto por ADN circular y tiene por lo menos tres plásmidos que están relacionados pero son diferentes. *Streptococcus mutans* tiene una pared celular gruesa y retiene violeta de genenciana. La pared celular está compuesta de peptidoglucano (mureina) y ácidos teicoicos que previenen lisis osmótica de protoplasto celular y confiere rigidez y forma a la célula.

Uno de los factores virulentos de *S. mutans* en cariogenicidad es su habilidad de adherirse a la superficie dental y la capacidad de formar una biopelícula. *S. mutans* se adhiere a la superficie, produce capa pegajosa, se divide y forma microcolonias dentro de la capa y comienza a construir una biopelícula.

Se adhiere específicamente a la película del diente por medio de una proteína en la superficie de la bacteria. *S. mutans* crece y sintetiza una cápsula de dextrano que se une al esmalte y forma un biofilm de unas 300-500 células. En el metabolismo de *S. mutans* es capaz de dividir (después de consumir carbohidratos que provee la dieta animal) en glucosa más fructosa. La fructosa es fermentada como una fuente de energía para el desarrollo bacteriano. La glucosa se polimeriza en un polímero dextrano extracelular que une a *S. mutans* al esmalte del diente y se convierte en la matriz de la placa dental.

La formación de placa dental en las superficies dentales involucran tres pasos. Primero, formación de la película condicionante sobre el esmalte. Segundo, la subsecuente adherencia de células a la superficie de los primeros colonizadores, tercero, interacción de célula con célula de colonizadores secundarios entre ellos así como con los primeros.

Los biofilms son comunidades de bacterias sésiles adheridas a una superficie, su formación ocurre en respuesta de una variedad de señales ambientales. *S. mutans* sufre un programa de desarrollo en respuesta de señalizaciones que lleva a la expresión de nuevos fenotipos que distinguen células sésiles de células plantónicas. La importancia con respecto al aspecto médico de los biofilms es que las células dentro de un biofilm pueden ser hasta 1,000 veces más tolerantes a los antibióticos y esto hace más complicado erradicar *S. mutans*.

S. mutans es un parásito animal, especialmente para animales que tienen una dieta alta en carbohidratos (sucrosa, fructosa y glucosa) y es bien conocido agente causal de la caries dental humana.

S. mutans es el principal contribuyente de la caries dental y se encuentra por lo general en superficies dentales. Un diente puede tener un número grande de estas bacterias, mientras el diente adyacente puede tener un número pequeño. Las bacterias se concentran más en los crevículos, desgastes, fisuras que son estructuras que se encuentran

comúnmente en el diente y alrededor. Los adultos pueden tener una alta concentración de *S. mutans* en la boca. En contraste, los niños tienen una menor concentración, pero son más vulnerables a las bacterias.

El *S. mutans* se encuentra asociado a lesiones cariosas radiculares. En pacientes con enfermedad periodontal, al eliminar la flora periodontopatógena, se observó que había un incremento de *S. mutans*. Por lo que se dice que puede ser un antagonista de los periodontopatógenos (Quirynen and Gizani, 1999).

Los *S. mutans* son sensibles a la clorhexidina por lo que un colutorio de clorhexidina por 30 segundos puede reducir su número significativamente y tener un mayor control de la colonización de esta bacteria (Jones, 1997).

Fine y Furgang en 2000. evaluaron el efecto de enjuagues de aceites esenciales en el número de *S. mutans* y otros estreptococos en la placa subgingival y en saliva, encontrando que los enjuagues lograban reducir el número de estreptococos y principalmente el de *S. mutans*.

Van der Reijden y cols. en 2001 investigaron la presencia de *S. mutans* en la placa subgingival en pacientes en tratamiento periodontal. Observaron que las proporciones de *S. mutans* y *P. gingivalis* están correlacionadas en forma negativa. Encontraron mayor presencia de *S. mutans* en pacientes después de haber concluido su tratamiento periodontal. Esta interacción puede ser causada porque *P. gingivalis* no puede crecer en un pH menor que 6.5, una circunstancia ecológica que puede ser provocada por *S. mutans*.

Ciertas especies bacterianas muestran fuerte adherencia a las membranas, entre ellas *S. mutans* ha sido reportado como especie pionera en la agregación de placa bacteriana mientras otras especies actúan como destructoras de tejido periodontal (Chen y cols., 1997).

La adherencia de *S. mutans* a las superficies inorgánicas es principalmente el resultado de una interacción mediada por un glucano. Los *S. mutans* pueden producir diversos tipos de polisacáricos que contribuyen a la unión entre células de *S. mutans* y otras células.

Los *S. mutans* también se pueden unir a proteínas del huésped como fibronectina, aglutininas salivales y beta macroglobulina agregada. Además *S. mutans* tiene una

lectinas galacto-específica en la superficie celular que une el organismo con la película y la matriz de la placa uniéndose a sustancias extracelulares que contienen carbohidrato.

Además de la alta adherencia, *S. mutans* ha sido asociada con endocarditis bacteriana. El grupo viridans de los estreptococos es bien conocido como el más común causante de endocarditis bacteriana. *S. mutans* posee un antígeno de superficie también presente en el corazón humano, tejidos del riñón y músculos. Por lo tanto una vacuna contra *S. mutans* puede tener una reacción cruzada con tejidos del corazón y del riñón. Ya que los *S. mutans* son bacterias predominantes que se adhieren a las membranas debe de considerarse el daño de estas bacterias en otros tejidos (Chen y cols, 1997).

Hung y cols. en 2002 compararon la invasión de *S. mutans* y *A. actinomycetemcomitans* a través de 3 membranas, una de PTFE-e, otra de compuesto de poliglicólido y una de colágeno tipo I. La de PTFE-e fue la menos afectada, *S. mutans* atraviesa más rápido que *A.a.*

S. mutans es una de las bacterias más fuertes en adherirse a una membrana. Las bacterias pioneras que se adhieren en un inicio a los biomateriales , pueden multiplicarse y ocasionar una infección o proveer una base para la co-agregación secundaria de microorganismos (Wang y cols., 1994).

4.10 Streptococcus sanguinis

Clasificación:

Reino: Bacteria

Filo: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Lactobacillales

Familia: Streptococcae

Género: *Streptococcus*

Especie: *S. viridans*

También conocida como: *Streptococcus sanguis*

Descripción y significado:

Streptococcus sanguinis es una bacteria Gram-positiva, no móvil, que no forma esporas y se puede encontrar en boca en estado de salud. Este microorganismo se encuentra por lo general en placa dental, que puede después colonizar las caries dentales. También se encuentra en torrente sanguíneo, el cuál permite que habite válvulas cardiacas ocasionando endocarditis bacteriana, una enfermedad cardiaca importante que puede llevar a la muerte.

Tiene un ADN circular que consiste de 2,388,435 pares de bases. El tamaño de la secuencia es significativamente más grande que el genoma de los demás estreptococos. *S. sanguinis* tiene un mayor porcentaje de bases de guanina y citosina (43.4%) que otros, lo que requiere mayor energía para romper el lazo de hidrógeno durante su replicación.

S. sanguinis es una bacteria Gram-positiva en forma de coco que tiene una pared celular gruesa que consiste en un peptidoglucano (mureína), así como ácidos teicóicos.

Este organismo tiene un sistema muy bien construido para la producción de energía a pesar de tener un círculo de Krebs incompleto.

Contiene muchas enzimas que ayudan a los procesos metabólicos, incluyendo la biosíntesis, gluconeogénesis, fermentación de azúcar y carbohidratos, etc.

S. sanguinis se une directamente a superficies orales y sirve como anclaje para que una variedad de microorganismos distintos se adhieran, los cuáles colonizan la superficie dental, forman placa dental y contribuyen con la etiología de caries y enfermedad periodontal.

Estudios demuestran que el gen SrtA en *S. sanguinis* participa en anclar proteínas adhesinas en la superficie bacteriana, sin embargo, es principalmente efectiva en su adhesión a las células epiteliales. Los estreptococos orales colonizan la superficie suave

del diente usando interacciones hidrofóbicas. Basado en los resultados de los experimentos, los cuáles sugieren que la disminución de la hidrofobicidad se debe a la ausencia del gen SrtA, se indica que el gen SrtA puede tener un rol en la adherencia dental, materiales dentales de restauración y células epiteliales en la cavidad oral.

Como agente clave de la endocarditis infecciosa, *S. sanguinis* puede entrar al torrente sanguíneo y dañar las válvulas cardiacas. Una endocarditis puede ser causada por la entrada de estreptococos orales al torrente sanguíneo durante procedimientos dentales o hasta durante actividades normales del diario como alimentarse.

Es α -hemolítico. En conjunto con *S.mitis* es una de las especies en colonizar primero la superficie dental limpia y en un corto lapso de tiempo ya se pueden aislar en gran número. Ausente en individuos edéntulos, indica que su principal hábitat es el diente. Por su gran distribución se dice que es parte de la flora autóctona de la boca. Factores ambientales como densidad celular, disponibilidad de nutrientes y pH influyen en la interacción entre estreptococos: *S. sanguinis* y *S. mutans*. Peróxido de hidrógeno es producido por *S. sanguinis*, su presencia puede disminuir el crecimiento de *S. mutans*.

En un ambiente rico en nutrientes la producción de peróxido se termina y la energía requerida para la producción de peróxido se utiliza ahora para el crecimiento celular. Por otro lado, si no hay suficientes nutrientes o el pH del medio es bajo, se activa la producción de peróxido de hidrógeno permitiendo la competencia contra *S. mutans*. Por lo tanto el medio regula la competencia y co-existencia de *S. sanguis* y *S. mutans*.

También se han descrito interacciones antagonistas entre *S. sanguinis* y porfiromonas en vivo, esto puede estar relacionado con la resistencia hacia la colonización después de una infección por estreptococos gram positivos, pero también por cambios en el potencial redox en la placa subgingival. (van der Reijden y cols., 2001)

La habilidad de ciertas bacterias para poder colonizar depende principalmente de mecanismos de adherencia más que del crecimiento. *Actinomyces viscosus* y *S. sanguis* son colonizadores iniciales de la película dental.

Son bacterias no patogénicas que forman una mono capa, así facilitando la adherencia de las bacterias subsecuentes (cocos gram negativos, bacilos gram negativos y

filamentos). Alteran el medio local, producen cambios en la tensión del oxígeno local, facilitando de esta forma la colonización de especies facultativas y anaerobias.

El periodonto puede ser afectado directamente por la producción de toxinas bacterianas, enzimas o productos de metabolismo de la placa dental o indirectamente estimulando la respuesta del huésped (Shibly and Rifai, 1995).

Aunque puede fermentar azúcares en ácido láctico, hay poca evidencia de que sea cariogénica. Sin embargo, en vista de su habilidad para adherirse a las superficies dentales, es considerado pionero de la colonización dental y debe por lo tanto ser considerado importante en la iniciación de la formación de placa dental.

Stingu y cols. en 2008 evaluaron la presencia de varios tipos de estreptococos en pacientes sanos y en pacientes con periodontitis agresiva. Encontraron que sólo hubo diferencia significativa de *S. sanguinis* con mayor presencia en pacientes sanos. Es una especie benéfica en la prevención de caries dental, ya que antagonizan *S. mutans*.

También Hillman detectó que cuando *S. sanguinis* estaba presente había mucho menor presencia de *T. forsythia*. Tiene la capacidad de inhibir *P. intermedia* y también puede inhibir el crecimiento de *A. actinomycetemcomitans* con la producción de peróxido de hidrógeno por *S. sanguinis*. Sin embargo *A. actinomycetemcomitans* puede producir una bacteriocinas que mata *S. sanguinis* pero parece tener mínimo efecto en presencia de *P. gingivalis*.

5. MARCO DE REFERENCIA

Para mejorar los resultados de la regeneración se debe evitar cualquier tipo de contaminación e infección en el sitio. Se han ido desarrollando varias opciones para evitar esta contaminación. Una de éstas opciones es utilizar membranas de colágeno impregnadas de antibióticos que se han orientado a reducir el riesgo de infección bacteriana (Chang, 2000).

Las bacterias orales colonizan las membranas, las diferentes especies tienen capacidad variable para colonizarlas. *Streptococcus mutans*, por ejemplo es una bacteria que presenta una gran adherencia a todas las membranas (Hung, 2002).

Algunos estudios han puesto a prueba membranas cargadas con tetraciclina o metronidazol que resultan en menor incomodidad para el paciente y mayor ganancia de niveles de inserción (Chen y cols., 2003).

Grevstad y Leknes en 1993, examinaron la estructura de la placa de membranas de PTFE-e retiradas entre las 4-6 semanas después de la regeneración, que se habían expuesto.

Se observaron 3 grupos de agregación bacteriana estructuralmente distintos:

- 1.- Capa densa de cocos gram positivos y bacilos, dominaban zona mas externa.
- 2.- Cocos bacilos y filamentos en fibrina
- 3.- Mezcla de gram positivos así como de gram negativos y espiroquetas en la parte oclusiva de la membrana.

Quiere decir que la microflora fue cambiando de bacterias gram positivas a gram negativas conforme se fue profundizando la placa.

Los pacientes fueron medicados con penicilina y hacían colutorios de clorhexidina sin embargo no se pudo evitar la contaminación.

Las membranas expuestas proveen un ambiente ideal para la adherencia y multiplicación bacteriana. Ni la amoxicilina ni la tetraciclina interfieren en la adherencia de células del ligamento periodontal a las membranas. Sin embargo, la adherencia de

células sí se ve afectada cuando las membranas se encontraban contaminadas con *S. mutans* o *A. actinomycetemcomitans*. Se disminuye la adherencia en membranas pre-inoculadas con *S. mutans*. Sin embargo las membranas con amoxicilina o tetraciclina pueden revertir este proceso. Por lo que las membranas cargadas con antibióticos pueden mejorar la adherencia celular cuando ésta se encuentra contaminada (Hung y cols, 2005).

Markman en 1995 evaluó si una membrana puede impregnarse con hidrocloreto de tetraciclina y si éste puede liberarse en concentraciones inhibitorias mínimas por un periodo compatible con la aplicación clínica. El antibiótico se liberó lentamente del día 1 al 12, disminuyendo su concentración. Por lo tanto la membrana de celulosa impregnada con hidrocloreto de tetraciclina podía utilizarse en RTG tanto como barrera como para objeto de liberación de agente quimioterapéutico para eliminar periodontopatógenos.

Lyons y cols. en 2008 evaluaron si la liberación sostenida de 4% de doxiciclina de una barrera reabsorbible, podía mejorar los resultados de RTG en lesiones de furca grado II. El objetivo fue reducir la carga bacteriana utilizando un antibiótico local.

Yoshinari y cols. en 2001 aplicaron un ungüento de minociclina a las barreras una vez a la semana por 8 semanas seguidas. Zarkesh y cols. en 1999 por su parte impregnaron membranas de PTFE – e con tetraciclina y la dejaron in situ 6 semanas, en ambos estudios se observó mayor ganancia en niveles de inserción cuando se aplicaba algún antibiótico local que con las membranas solas. Yoshinari 40% contra 25%, Zarkesh 45% contra 23%.

Zarkesh y cols. en 1999 evaluaron los efectos clínicos y microbiológicos de membranas cubiertas con tetraciclina en defectos infraóseos de 2 y 3 paredes alrededor de molares. Si hubo mayor ganancia de niveles de inserción promedio con las membranas de PTFE-e con tetraciclina, sugiriendo que las membranas cubiertas por tetraciclina pueden resultar en una mayor ganancia de inserción clínica, muy probablemente debido a las propiedades de la tetraciclina en la coagulación inicial. La tetraciclina tiene amplio espectro contra las bacterias periodontales. Puede unirse a superficies radiculares desmineralizadas. Mejora adherencia y crecimiento de fibroblastos en superficie dentinaria, tiene propiedades anti colagenasa y antiinflamatoria.

También se ha evaluado la adición de 25% de doxiciclina a una membrana biodegradable encontrando mayor formación ósea en los defectos tratados con doxiciclina, se sugiere que puede beneficiar la osteogénesis (Chang y cols., 2000).

Chen y cols. en 2003 evaluaron si la incorporación de clorhexidina a varias membranas para RTG mejora la inserción de células del ligamento periodontal en presencia de *A. actinomycetemcomitans*. Como se ha descrito que el tratamiento con clorhexidina merma la viabilidad de las células del ligamento periodontal dependiendo de la dosis aplicada. Aplicando 15 microgramos por mililitro de clorhexidina, la viabilidad relativa celular se reduce al 50% . Por lo tanto se añadió 10 microgramos por mililitro de clorhexidina a las membranas. No hubo cambio morfológico o adherencia relativa de células del ligamento periodontal con las membranas con clorhexidina en estas cantidades. Las membranas fueron incubadas con *A. actinomycetemcomitans*, un grupo con clorhexidina, el grupo control sin clorhexidina y se observó mayor adherencia de células del ligamento periodontal en el grupo experimental.

También se ha añadido metronidazol a membranas de ácido poliláctido que fueron probadas en perros y se demostró que en el grupo experimental se formó mayor cantidad de cemento hueso y tejido conectivo que en el grupo control (Kurtis y cols., 2002).

La cobertura de las membranas con antimicrobianos representa una manera de controlar aún más las infecciones asociadas con barreras en las etapas tempranas de la cicatrización (Zarkesh y cols., 1999).

Membracell®, las membranas que fueron utilizadas en este estudio, las cuáles vienen ya sea con metronidazol o clorhexidina, son productos de una alta purificación de tejido conectivo de animales jóvenes reconstituída en láminas y estarán compuestas por colágeno tipo I y vestigios de ácido láctico y glicerol. Las características macroscópicas del material son su transparencia y textura uniforme. Al humedecerse unos segundos en solución acuosa adquiere mayor resistencia y se facilita su manipulación. Se ha comprobado regeneración ósea en defectos generados en calota de ratas de laboratorio. El cultivo de queratinocitos humanos in vivo sobre la membrana demostró la biocompatibilidad del material.

Membracel®-O con digluconato de clorhexidina es una membrana sumamente útil en los casos donde se requiera la lenta liberación de un antibacteriano, que actúa a medida que la membrana se va reabsorbiendo.

Membracel®-O con metronidazol: es una membrana reabsorbible con agregado de metronidazol, eficaz contra microorganismos anaerobios.

6. MÉTODOS

6.1 Muestras

Para realizar este estudio se utilizaron 20 muestras para *S. mutans* y 20 muestras para *S. sanguinis*. En caso de contaminación de la muestra o bien si no se observaba crecimiento bacteriano, estas muestras fueron desechadas y reemplazadas para que el total de muestras siempre fueran 20 para cada grupo de bacteria.

Se utilizaron medios de cultivo de infusión cerebro-corazón, agar mitis salivarius con telurito y bacitracina para *S. mutans* y agar sangre para *S. sanguinis*.

Además se utilizó una incubadora de CO₂ y una cámara de flujo laminar para hacer el experimento dentro de un ambiente estéril.



Figura 1. Preparación de cultivos

6.2 Reconstitución de las bacterias

Para realizar este proyecto de investigación se utilizaron cepas ATCC 35668 de *S. mutans* y cepa ATCC 10566 de *S. sanguinis*. Para poder utilizar estas cepas de inicio hay que reconstituirlas o revivirlas.

Se prepararon medios de cultivo BHI (infusión cerebro-corazón) y caldo de Todd Hewitt. En tubos de ensayo se colocaron 5ml de cada medio de cultivo para la reconstitución de las bacterias ATCC.

Además también se preparó agar de mitis salivarius con telurito y bacitracina para la siembra en cajas de *S. mutans* 35668 y por otra parte se preparó medio agar-sangre para la siembra en cajas de *S. sanguinis* 10566.

Todos los medios de cultivo fueron esterilizados e incubados a 37° por 24 hrs. para probar su esterilidad.

En el caso de las cepas de *S. mutans* ATCC 35668 y *S. sanguinis* ATCC 10566 las bacterias vienen liofilizadas y traen una pipeta con la solución para hidratar a la bacteria en cuanto se rompe una cápsula. Se rompe la cápsula y la bacteria se agrega directo a los tubos con medio de cultivo de tioglicolato y de infusión cerebro-corazón. También se hizo una siembra de las bacterias en cajas.

Tanto los tubos inoculados como las cajas se meten a la incubadora de CO₂ y se dejan 24 horas para ver su crecimiento.

A las 24 horas se sacan los tubos y las cajas sembradas con las bacterias *S. mutans* ATCC 35668 y con *S. sanguinis* 10566. Se observa crecimiento de las bacterias tanto en los tubos como en las cajas.

Las bacterias de las cajas fueron observadas al microscopio para confirmar que además de haber crecimiento bacteriano, éstas tuvieran las características correspondientes.

Las bacterias de las cajas se vuelven a sembrar en tubos con medio de cultivo limpio y se meten a la incubadora de nuevo. Esto para asegurarnos de obtener más cantidad de bacteria en caso de que haya un problema durante el estudio.

Las bacterias de los tubos se lavan, esto se realiza con ayuda de una centrífuga 5000 RPM 5 minutos, cuando salen los tubos de la centrífuga se observan las bacterias precipitadas al fondo del tubo, se tira el medio de cultivo y se le agrega al tubo agua salina isotónica estéril. El procedimiento se repite tres veces. Al final se le coloca solución salina isotónica estéril. Es así como ya están listas para sembrarse en las cajas.



Figura 2. Bacterias ATCC



Figura 3. Reconstitución de las bacterias

6.3 Preparación de las membranas para el estudio.

El objetivo del estudio fue comparar el efecto antibacteriano de dos membranas de colágeno preparadas con metronidazol y clorhexidina. Para el grupo control se utilizaron membranas de colágeno Osseoguard® (Biomet 3i).

Todas las membranas o barreras para regeneración que se utilizaron en este estudio son membranas de colágeno.

El control del estudio fue la membrana de colágeno sin ningún medicamento añadido. La membrana de colágeno utilizada como control en este estudio fue la membrana Osseoguard® (Biomet 3i). Es una matriz de membrana no friable de color blanco elaborada a partir de fibras de colágeno tipo I altamente purificadas obtenidas a partir de tendón de Aquiles bovino. Osseoguard® es reabsorbible.

La membranas a estudiar son membranas de colágeno tipo I con agregado de metronidazol y clorhexidina.

MEMBRACEL®-O con Metronidazol es una membrana de colágeno puro, transparente, semiporosa, adherente con un agregado de metronidazol eficaz contra

microorganismos anaeróbicos. Útil en situaciones clínicas dónde se requiera la lenta liberación de este antiséptico.

MEMBRACEL®-O con digluconato de clorhexidina es una membrana también de colágeno, transparente pero con agregado de digluconato de clorhexidina que puede ser útil en los casos donde se requiera la lenta liberación de un antibacteriano, que actúa a medida que la membrana se va reabsorbiendo.

Las membranas de colágeno, de metronidazol y de clorhexidina fueron recortadas con una perforadora de 6 mm de diámetro, previamente esterilizada y se utilizó una perforadora distinta para cada tipo de membrana. Se utilizaron cajas petri de cristal estériles para colocar cada tipo de membrana ya recortada y tenerlas preparadas para el estudio. El recorte y recolección de las membranas se realizó dentro de una campana de flujo laminar para mantener la esterilidad de las membranas lo mejor posible. Una vez recortadas y recolectadas las membranas según el tipo, se cerraron las cajas petri y se sellaron con parafilm para evitar cualquier tipo de contaminación. La manipulación de las membranas se realizó con pinzas de curación y guantes estériles.



Fig 4a. Membrana de colágeno



Fig 4b. Membrana con metronidazol



Fig 4c. Membrana con clorhexidina



Figura 5. Preparación de las membranas

6.4 Siembra de las cajas

Las cajas con mitis salivarius agar tenían 3 divisiones, cada una fue marcada con un número y rotulada con el nombre de cada una de las membranas.

Las cajas con el agar sangre no estaban divididas así que se dividieron por la parte externa, se enumeraron y se rotuló cada división con el nombre de cada una de las membranas.

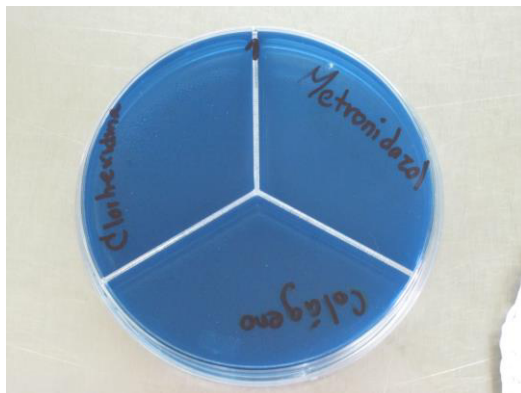


Figura 6. Rotulación de cajas

Para que el estudio sea reproducible se debe ajustar el inóculo al nefelómetro de Mcfarland (sulfato de bario y otras sustancias). Para este estudio se utilizó el grado 0.5 (10 millones de bacterias).

En tubos de ensayo con solución salina isotónica estéril, se le fueron agregando de poco a poco 200 microlitros del inóculo con pipetas con puntas estériles hasta igualar la

turbidez con la del 0.5 del nefelómetro de Mcfarland. Una vez que se igualó la turbidez del inóculo con el nefelómetro, ya está lista la bacteria para sembrarse en las cajas.



Figura 7. Ajuste del inóculo



Figura 8. Bacterias para siembra

Para *S. mutans* ATCC 35668 se utilizaron cajas petri con 3 divisiones con medio agar mitis salivarius. Se siembra de manera masiva, mojando un isopo grande en el tubo con la bacteria y se realiza en 3 distintas direcciones sin dejar espacios sin sembrar. El crecimiento bacteriano debe quedar parejo.

Terminando de sembrar cada caja se coloca cada una de las membranas en cada apartado o división fijándose en colocarlo en el sitio correspondiente y tratando de centrarlas lo mejor posible para no quedar cerca de las divisiones. Al colocarlas se apoya la pinza en el centro para fijar un poco la membrana en el sitio. Se utilizó una pinza diferente para cada tipo de membrana para no contaminarlas.

Este procedimiento se llevó a cabo dentro de la cámara de flujo laminar para evitar la contaminación de las cajas con otro microorganismo.

Las cajas sembradas y con las membranas se cierran, se sellan y se meten en la incubadora.

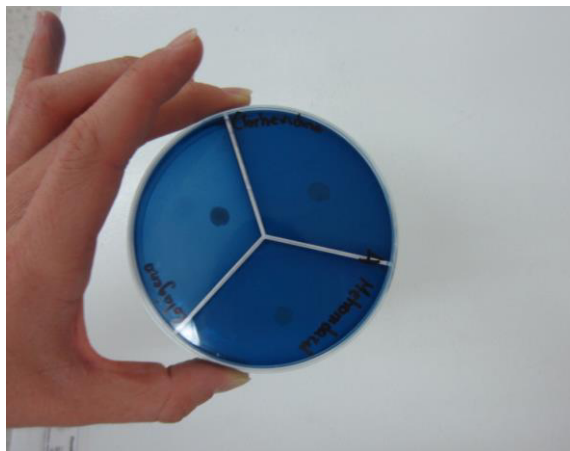


Figura 9. Caja sembrada y con membranas

6.5 Recolección de datos

Se realiza la observación de crecimiento bacteriano y medición de halo inhibitorio, en caso de haberlo a las 24hrs., 48hrs., y 7 días.



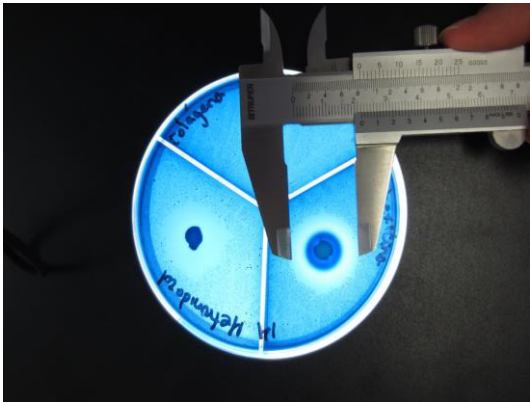
Figura 10. Crecimiento bacteriano

Los discos fueron examinados y se evaluaron las zonas inhibitorias alrededor de cada membrana, como evidencia de ausencia de colonización bacteriana (aclaramiento del agar) adyacente a cada barrera en 360 grados.

El segmento más uniforme de la zona de aclaración fue medido con un Vernier. Una zona promedio de inhibición fue determinada para cada barrera.

Las zonas más amplias de inhibición fueron interpretadas para indicar mayor actividad antimicrobiana de las barreras involucradas.

Figura 11. Medición de halos inhibitorios



Ficha de recolección de datos

Se recolectaron los datos en dos fichas distintas, cada una de ellas corresponde a una de las bacterias utilizadas.

No. de Muestra	Membrana	Tiempo de medición	Halo inhibitorio (mm)
1	Colágeno		
	Clorhexidina		
	Metronidazol		

6.6 Determinación del tamaño muestral

Por las condiciones de la variable a evaluar del tipo cuantitativa donde además, se trata de una población infinita se estima el tamaño de la muestra con la aplicación de la siguiente fórmula general:

$$n = \frac{z^2 p(1-p)}{e^2}$$

Para el presente proyecto se han determinado los siguientes valores que serán aplicados para determinar el tamaño de la muestra:

$z = 1.96$ para 95% confiabilidad

$p = 0.90$

$e = 0.13$

Para obtener el tamaño de la muestra se sustituyen los valores y se obtiene que:

$$n = \frac{(1.96)^2 (0.90)(1 - 0.90)}{(0.13)^2} \quad n = 20.46 \approx 20$$

De aquí se obtiene que el número total de casos del estudio será de 20 muestras por grupo o por bacteria.

6.7 Método estadístico

Los datos recolectados de las medidas se analizan estadísticamente comparando de las zonas de inhibición para cada barrera debajo de cada grupo bacteriano utilizando un análisis de varianza.

La prueba de T de Student se puede utilizar para evaluar la presencia de diferencias estadísticamente significativas entre cada grupo de materiales entre los cultivos.

7. RESULTADOS

7.1 Halos inhibitorios de las membranas con clorhexidina

Los halos de inhibición bacteriana alrededor de las membranas con clorhexidina fueron evidentes cuando se probaron con las bacterias *S. mutans* y *S. sanguinis*.

Tabla 1. Efecto de la membrana con clorhexidina *in vitro* con *S. mutans*

Halo inhibitorio en mm	Frecuencia con la que se presenta					
	24 hrs		48 hrs		7 días	
21 mm	2	10%	2	10%	2	10%
22 mm	5	25%	8	40%	8	40%
23 mm	12	60%	9	45%	9	45%
24 mm	0	0%	0	0%	0	0%
25 mm	1	5%	1	5%	1	5%

El halo inhibitorio promedio de la clorhexidina en el cultivo de *S. mutans* fue de 22.65 ± 0.87 mm a las 24 horas y de 22.5 ± 0.88 mm a las 48 horas y a los 7 días.

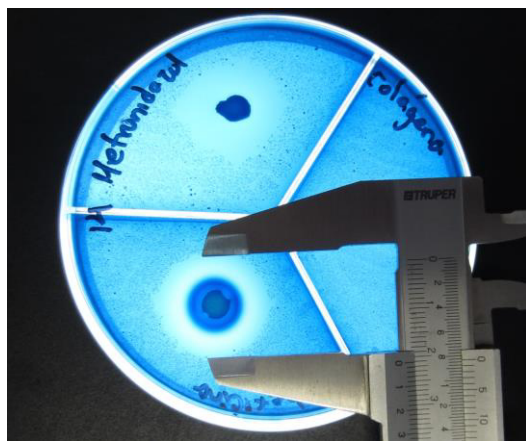


Figura 12. Medición halo inhibición clorhexidina - *S. mutans*

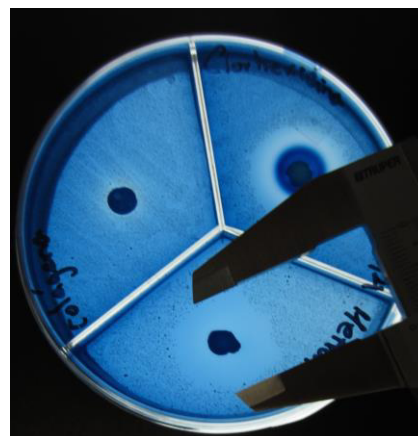


Figura 13. Medición halo inhibición metronidazol - *S. mutans*

Tabla 2. Efecto de la membrana con metronidazol *in vitro* con *S. mutans*

Halo inhibitorio en mm	Frecuencia con la que se presenta					
	24 hrs		48 hrs		7 días	
12 mm	0	0%	1	5%	1	5%
14 mm	1	5%	0	0%	0	0%
20 mm	1	5%	1	5%	1	4%
21 mm	2	10%	3	15%	3	15%
22 mm	3	15%	5	25%	5	25%
23 mm	3	15%	2	10%	2	10%
24 mm	3	15%	3	15%	5	25%
25 mm	4	20%	4	20%	2	10%
26 mm	2	10%	0	0%	0	0%
29 mm	1	5%	1	5%	1	5%

El halo inhibitorio promedio de la clorhexidina en los cultivos de *S. sanguinis* fue de 14.97 ± 1.25 mm a las 24 horas, 14.22 ± 0.87 mm a las 48 horas y de 13.57 ± 0.87 mm a los 7 días.

El halo inhibitorio que se observa alrededor de la membrana con clorhexidina en el cultivo de *S. mutans* fue mayor que el halo inhibitorio observado alrededor de la membrana en el cultivo de *S. sanguinis*.

No se observa una disminución significativa del halo inhibitorio alrededor de la membrana de clorhexidina observada a las 24 horas, 48 horas ó 7 días, en ninguno de los cultivos con las distintas bacterias.

7.2 Halos inhibitorios de las membranas con metronidazol

Los halos de inhibición bacteriana alrededor de las membranas con metronidazol fueron evidentes cuando se probaron en los cultivos de *S. mutans*, sin embargo apenas son perceptibles alrededor de las membranas cuando se probaron con los cultivos de *S. sanguinis*.

Tabla 3. Efecto de la membrana con Clorhexidina *in Vitro* con *S. sanguinis*

Halo inhibitorio en mm	Frecuencia con la que se presenta					
	24 hrs		48 hrs		7 días	
12 mm	0	0%	0	0%	1	5%
12.5 mm	0	0%	0	0%	2	10%
13 mm	1	10%	5	25%	5	25%
13.5 mm	1	10%	0	0%	1	5%
14 mm	6	30%	5	25%	8	40%
14.5 mm	2	10%	3	15%	2	10%
15 mm	5	25%	6	30%	1	5%
15.5 mm	2	10%	0	0%	0	0%
16 mm	1	5%	1	5%	0	0%
19 mm	2	10%	0	0%	0	0%

El halo inhibitorio promedio del metronidazol en el cultivo de *S. mutans* fue de 23.2 ± 3.04 mm a las 24 horas y de 22.6 ± 3.23 mm a las 48 horas y de 22.5 ± 0.88 mm a los 7 días.

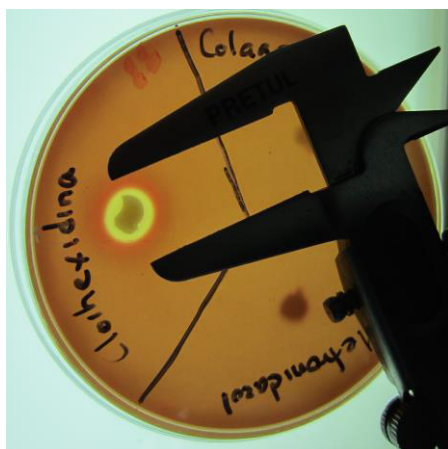


Figura 14. Medición halo inhibición clorhexidina -*S. sanguinis*.

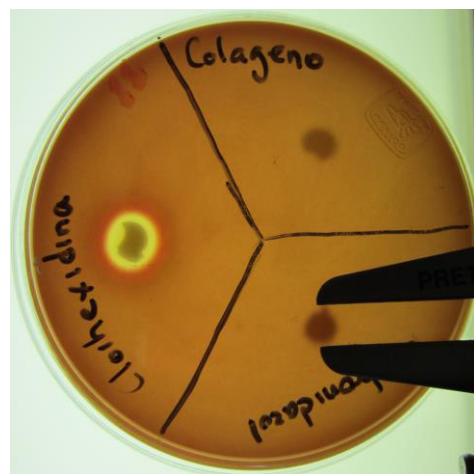


Figura 15. Medición halo inhibición metronidazol-*S. sanguinis*.

Tabla 4. Efecto de la membrana con Metronidazol *in Vitro* con *S. sanguinis*

Halo inhibitorio en mm	Frecuencia con la que se presenta					
	24 hrs		48 hrs		7 días	
6 mm	0	0%	0	0%	1	5%
6.5 mm	0	0%	2	10%	9	45%
7 mm	11	55%	12	60%	10	50%
7.5 mm	5	5%	5	25%	0	0%
8 mm	3	15%	1	5%	0	0%
8.5 mm	0	0%	0	0%	0	0%
9 mm	1	5%	0	0%	0	0%

El halo inhibitorio promedio del metronidazol en los cultivos de *S. sanguinis* fue de 7.37 ± 0.53 mm a las 24 horas, 7.12 ± 0.35 mm a las 48 horas y de 6.72 ± 0.30 mm a los 7 días.

El halo inhibitorio formado alrededor de las membranas con metronidazol fue mayor cuando se probó con cultivos de *S. mutans* que con cultivos de *S. sanguinis*.

El halo inhibitorio alrededor de la membrana con metronidazol en los cultivos de *S. mutans* disminuye en circunferencia en los tiempos de observación de las 24 horas a las 48 horas, sin embargo no hay cambios significativos para los 7 días.

El halo inhibitorio alrededor de la membrana con metronidazol en los cultivos de *S. sanguinis* no sufre cambios significativos en los distintos tiempos de observación. Aunque apenas es perceptible el halo inhibitorio, no se observa que las bacterias invadan la membrana como lo hacen en el grupo control.

No se encontró ninguna zona o halo de inhibición bacteriana alrededor de las membranas de colágeno, el grupo control. Tanto en los cultivos de *S. mutans*, como en los cultivos de *S. sanguinis*, además de no observarse halo inhibitorio alrededor de la membrana de colágeno, se observa que las bacterias invaden la membrana.

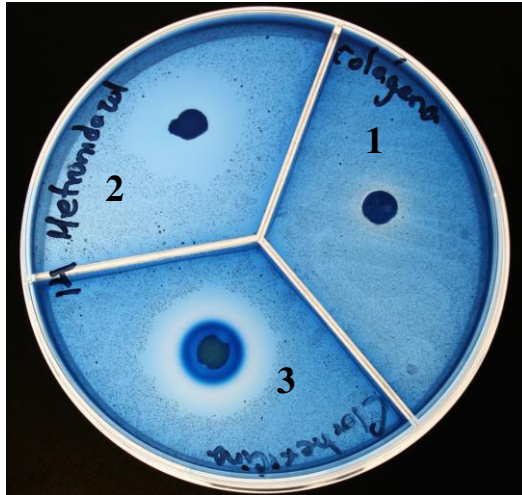


Figura 16. Evaluación y medición halo inhibitorio *S. mutans*.

1. Membrana de Colágeno
2. Membrana de Metronidazol
3. Membrana de Clorhexidina

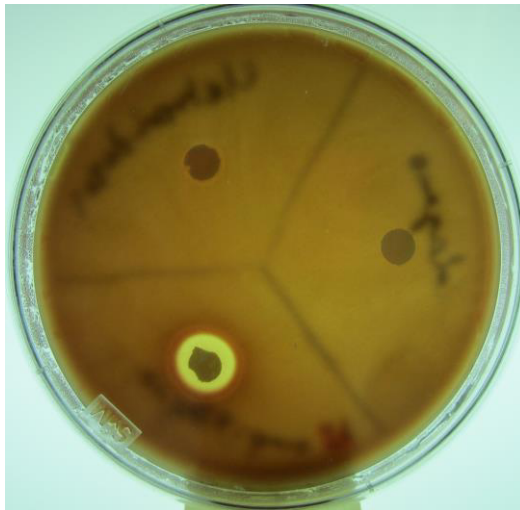


Figura 17. Evaluación y medición halo inhibitorio *S. sanguinis*

1. Membrana de Colágeno
2. Membrana de Metronidazol
3. Membrana de Clorhexidina

7.3 Análisis estadístico y gráficos:

Tabla 5.

Estadística descriptiva del halo de inhibición bacteriana para S. mutans según el grupo de estudio y momento

	24 Horas		48 Horas		7 Días
	Clorhexidina	Metronidazol	Clorhexidina	Metronidazol	Clorhexidina
Media	22.65	23.2	22.5	22.6	22.5
Moda	23	25	22	22	22
Mediana	23	23.5	22.5	22.5	22.5
DE	0.87	3.04	0.88	3.23	0.88
Varianza	0.76	9.28	0.78	10.46	0.78
Min	21	14	21	12	21
Max	25	29	25	29	25
Rango	4	15	4	17	4
Prueba t	0.3015		0.1814		0.5000

Al realizar las comparaciones para *S. mutans*, mediante una prueba t de student se observó que no existen diferencias estadísticamente significativas entre el halo de inhibición bacteriana de la clorhexidina y el metronidazol a las 24 horas ($p=0.3015$), 48 Horas ($p=0.1814$) y 7 días ($p=0.5000$).

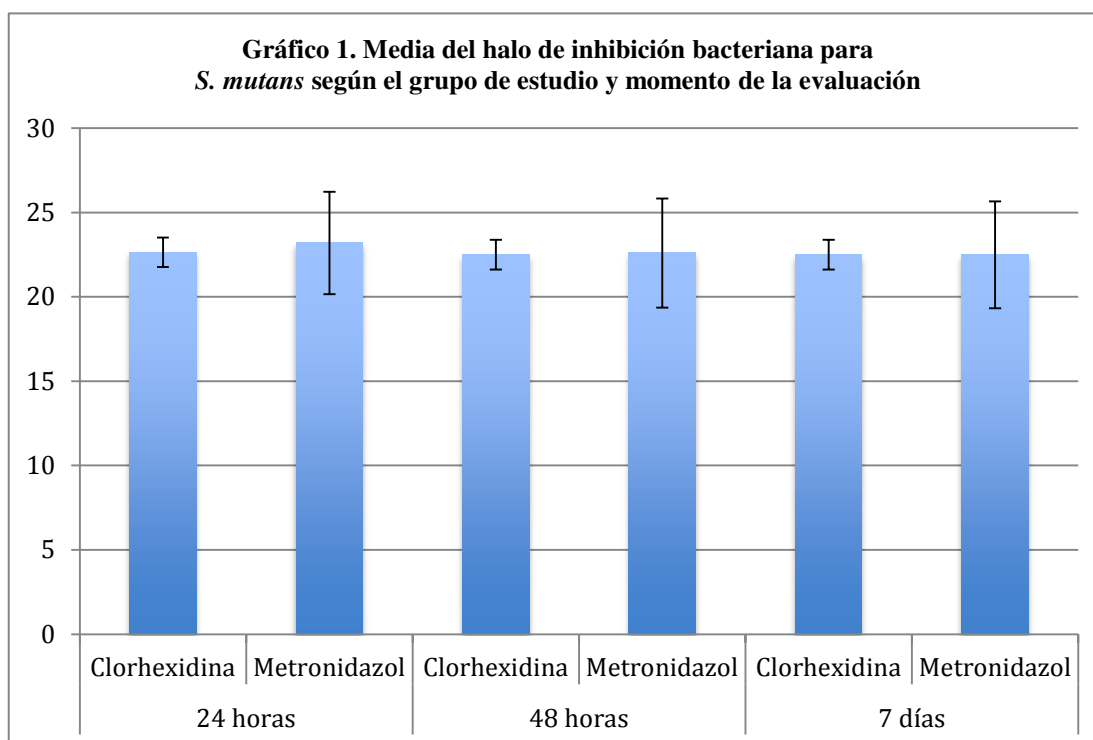


Figura 18.

Tabla 6.

Estadística descriptiva del Halo de inhibición bacteriana para S. Sanguinis según el grupo de estudio y momento de la evaluación

	24 Horas		48 Horas		7 Días	
	Clorhexidina	Metronidazol	Clorhexidina	Metronidazol	Clorhexidina	Metronidazol
Media	14.97	7.37	14.22	7.12	13.57	6.72
Moda	14	7	15	7	14	7
Mediana	14.75	7	14.25	7	14	6.75
DE	1.25	0.53	0.87	0.35	0.78	0.3
Varianza	1.57	0.28	0.77	0.12	0.61	0.09
Min	13	7	13	6.5	12	6
Max	19	9	16	8	15	7
Rango	6	2	3	1.5	3	1
Prueba t	0.0001		0.0001		0.0001	

Así mismo se realizaron pruebas para *S. Sanguinis*, mediante una prueba t de student, y en éste caso fue posible apreciar diferencias estadísticamente significativas entre el halo de

inhibición bacteriana de la clorhexidina y el metronidazol a las 24 horas ($p=0.0001$), 48 Horas ($p=0.0001$) y 7 días ($p=0.0001$)

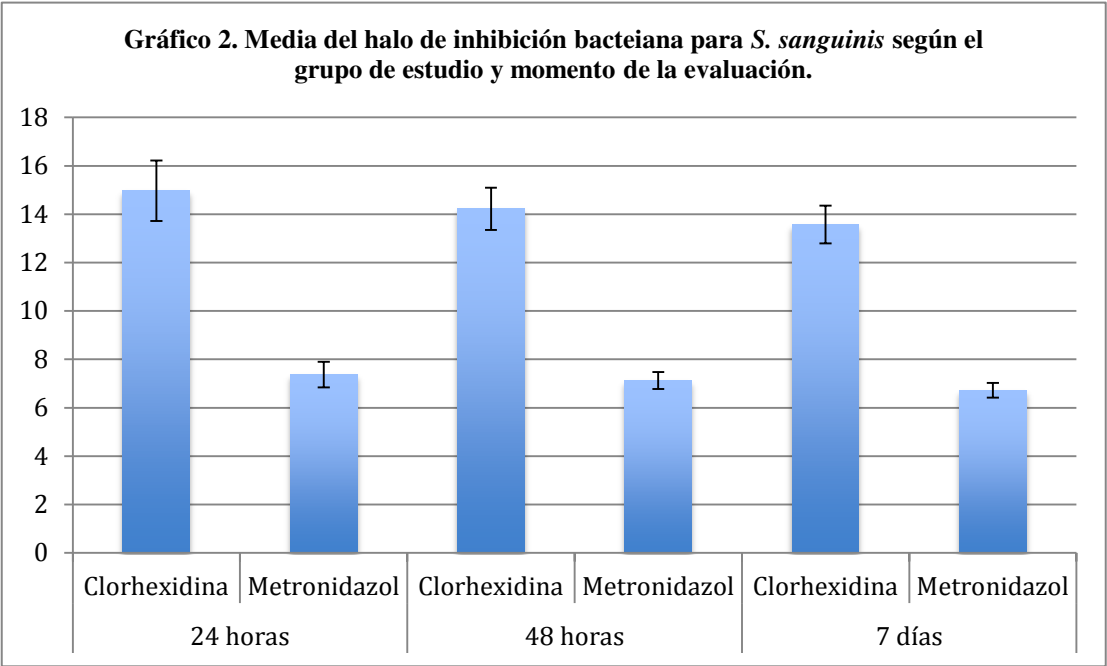


Figura 19.

8.DISCUSIÓN

Debido a que la enfermedad periodontal es una enfermedad que ocasiona destrucción de los tejidos de soporte del diente. Se ha estudiado, no sólo buscando la mejor forma de tratar la enfermedad, sino también la manera de recuperar parte de los tejidos perdidos. Lo ideal sería poder regenerar todos los tejidos periodontales y evitar perder el soporte de los órganos dentarios.

Hoy en día existen tratamientos como la regeneración tisular guiada y la regeneración ósea guiada que realizados de manera correcta aportan grandes beneficios en la reconstrucción de tejidos periodontales y de tejido óseo para la colocación de implantes. Aunque hay estudios en los que los resultados favorecen a los injertos en bloque, los resultados son satisfactorios. (Rocchietta y cols., 2016) De hecho se ha demostrado que el procedimiento de RTG es la mejor opción para rellenar el defecto óseo de forma horizontal. (Sanz y cols., 2015)

Ambos procedimientos requieren del uso de membranas, ya sean reabsorbibles o no reabsorbibles y uno de los principales factores de riesgo de un procedimiento regenerativo es la contaminación bacteriana. Esto puede ser debido a la exposición de la membrana y la acumulación bacteriana sobre ésta.

Si el injerto se contamina puede repercutir en la cantidad de tejido regenerado o en algunos casos puede llegar a perderse por completo.

Se ha puesto mucho énfasis en encontrar la forma de evitar la contaminación de las membranas en los procedimientos de regeneración.

Es de suma importancia lograr cubrir por completo la membrana con el colgajo sin tensión durante el procedimiento, sin embargo a pesar de que la membrana haya quedado perfectamente cubierta al terminar la cirugía, eso no nos asegura que en el periodo de cicatrización pueda exponerse y contaminarse.

Deben tomarse medidas anti-infecciosas como la eliminación por completo de la lesión previa, uso de antibióticos sistémicos, uso de antimicrobianos locales, en gel o en colutorios y realizar controles de placa dentobacteriana. Ya que existen estudios que

indican que la contaminación de la superficie de un biomaterial puede depender del estado de salud periodontal del paciente. (Martínez-H y cols., 2016)

El objetivo del presente trabajo fue determinar si un tipo de membranas que actualmente se están comercializando, las cuáles contienen sustancias antimicrobianas como la clorhexidina y el metronidazol, tienen efecto antimicrobiano *in Vitro* contra *Streptococos mutans* y *Streptococos sanguinis*, bacterias que comúnmente encontramos en medio oral y que son precursoras en la formación de placa dentobacteriana. Son bacterias que incluso en una exposición temprana de un implante a estas bacterias pueden ocasionar oxidación de la superficie. (Sridhar y cols., 2015)

Como control se utilizaron membranas de colágeno sin ningún antimicrobiano para ver cómo se comportaban las bacterias alrededor de éstas.

Los resultados nos indican que las membranas con clorhexidina y metronidazol si tuvieron algún efecto antimicrobiano contra las bacterias utilizadas en este proyecto. Además el efecto continuaba a las 24 horas, 48 horas y 7 días después de sembrar las cajas con las bacterias. En algunos casos el efecto iba disminuyendo con el paso de los días, sin embargo no fue estadísticamente significativo.

Por otro lado las membranas de colágeno puro del grupo control no presentaron ningún halo inhibitorio, al contrario bacterias crecieron por debajo de éstas.

Estos resultados coinciden con los estudios de Chang y cols, en 2009, en el cuál membranas impregnadas con antibiótico retrasaban la penetración bacteriana.

Otros autores (Hung y cols. 2005; Chen y cols. 2003) afirman que las bacterias impiden la adherencia epitelial y por lo tanto las membranas impregnadas con antibiótico pueden revertir este proceso.

Kurtis y cols. en 2002 evaluaron el potencial regenerativo de una membrana con metronidazol encontrando mejores resultados al utilizar esta membrana.

Por otro lado hay estudios que difieren con el presente en los beneficios que una membrana con antibiótico le puede proporcionar a un tratamiento de regeneración, ya que no encontraron diferencias significativas en los resultados de los grupos experimentales y los grupo control. (Lyons y cols. 2008)

Aparentemente ni la remoción mecánica de placa, ni la administración sistémica de antibióticos de amplio espectro previenen la colonización bacteriana de la membrana.

Para mejorar las condiciones que favorezcan la regeneración, se debe aplicar una técnica aséptica meticulosa, la aplicación tópica de un antibiótico en asociación directa con la membrana puede ser efectiva porque asegura una mayor concentración de la droga en el sitio.

Las membranas que contienen algún antimicrobiano pueden ser de gran utilidad para evitar acumulación bacteriana sobre la membrana y obtener mejores resultados de los procedimientos de regeneración. (Zarkesh y cols., 1999)

En base a este estudio ambas membranas tienen efecto antimicrobiano y pueden funcionar para inhibir el crecimiento bacteriano en tratamientos para regeneración.

La membrana con clorhexidina demostró ser la de mejor efecto antibacteriano con las dos bacterias utilizadas que son precursoras de la formación de biofilm (Hung y cols., 2002). Sin embargo hay estudios que nos indican que las bacterias que pueden ocasionar mayor destrucción de tejido son los periodontopatógenos (Marsh y cols., 2005) y en este caso la membrana con metronidazol sería más adecuada para inhibir el crecimiento de este tipo de bacterias anaerobias. (Mestnik y cols., 2010) Aunque hay estudios que no han obtenido mejorías en tratamientos periodontales utilizando metronidazol como adjunto de manera tópica y sistémica. (Bergamaschi CC y cols., 2016)

A pesar de que los resultados *in Vitro* de las membranas son positivos deben hacerse estudios *in Vivo* para descartar alguna reacción de cualquiera de los componentes con la cicatrización de los tejidos. (Chen y cols., 2003; John G. y cols., 2014)

9. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones experimentales del presente estudio se llegaron a las siguientes conclusiones:

1. Las membranas con clorhexidina y metronidazol si tienen efecto antimicrobiano *in Vitro* cuando fueron probadas con las bacterias *S. mutans* y *S. sanguinis*.
2. Las membranas de colágeno sin antimicrobianos no detuvieron el crecimiento de las bacterias.
3. El metronidazol y la clorhexidina tuvieron similar efecto en contra de la bacteria *S. mutans*.
4. La clorhexidina tuvo mayor efecto antimicrobiano que el metronidazol en contra de *S. sanguinis*.
5. La incorporación directa de un agente antimicrobiano a una membrana para RTG puede permitir mejor control de microorganismos.

10. RECOMENDACIONES

A pesar de que en el presente estudio se observa que la membrana de clorhexidina es la más eficaz en inhibir el crecimiento de las dos bacterias utilizadas en este estudio, debemos tomar en cuenta que debido a que hay estudios en los que se ha descrito que la clorhexidina puede ser citotóxica para los fibroblastos en ciertas concentraciones se recomendaría realizar estudios *in vivo* de las membranas y realizar pruebas de biocompatibilidad y citotoxicidad.

LITERATURA CITADA

- Asman B., Wijkander P. *Increased collagen degradation by experimentally induced granulation tissue inoculated with bacteria.* Journal of Clin Periodontol 1995; 22: 285-286.
- Baker, P.J. *Antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria from the human oral cavity.* J Dent Res, 1985. 64(10): p. 1233-44
- Becker W., Becker B.E. *Periodontal regeneration: a contemporary re-evaluation.* Periodontology 2000, 1999; 19:104-114
- Becker, W. *Root isolation for new attachment procedures. A surgical and suturing method: three case reports.* J Periodontol, 1987. 58(12): p. 819-26.
- Bergamaschi CC, Santamaria MP, Berto LA, Cogo-Müller K, Motta RHL, Salum EA, Notici Junior FH, Goodson JM, Gruppo FC. *Full mouth periodontal debridement with or without adjunctive metronidazole gel in smoking patients with chronic periodontitis. A pilot study.* J Periodontal Research 2016;51:50-59
- Bernales D. *Membranas de colágeno polimerizado: consideraciones sobre su uso en técnicas de regeneración tisular y ósea guiadas.* Rv Cubana Invest Biomed 2004;23(2):65-74
- Blumenthal, N. *The use of collagen membrane barriers in conjunction with combined demineralized bone-collagen gel implants in human infrabony defects.* J Periodontol, 1990. 61(6): p. 319-27.
- Bosshardt, D. *Does periodontal tissue regeneration really work?* Periodontol 2000, 2009. 51: p. 208-19
- Bunyaratavej, P. *Collagen membranes: a review.* J Periodontol, 2001. 72(2): p. 215-29.
- Chang, C.Y., Yamada S. *Evaluation of the regenerative effect of a 25% doxycycline-loaded biodegradable membrane for guided tissue regeneration.* J Periodontol, 2000. 71(7): p. 1086-93.

- Chen YT, Hung SL, Lin LW, Chi LY, Ling LJ. *Attachment of periodontal ligament cells to chlorhexidine-loaded guided tissue regeneration membranes*. J Periodontol, 2003. 74(11): p. 1652-9.
- Chen YT, Wang HL, Lopatin DE, O'Neal R, MacNeil RL. *Bacterial adherence to guided tissue regeneration barrier membranes exposed to the oral environment*. J Periodontol, 1997; 68(2):172-9.
- Cheng CF, Lee YY, Chi LY, Chen YT, Hung SL, Ling LJ. *Bacterial penetration through antibiotic-loaded guided tissue regeneration membranes*. J Periodontol, 2009. 80(9): p. 1471-8.
- Chogle, S. *An in vitro evaluation of the antibacterial properties of barriers used in guided tissue regeneration*. J Endod, 2003. 29(1): p. 1-3.
- Chung CP, Kim DK, Park YJ, Nam KH, Lee SJ. *Biological effects of drug-loaded biodegradable membranes for guided bone regeneration*. J Periodontal Res, 1997;32(1 Pt 2):172-5.
- Cortellini, P. *Periodontal regeneration of human intrabony defects with bioresorbable membranes. A controlled clinical trial*. J Periodontol, 1996. 67(3): p. 217-23.
- Cosyn J., Wyn J. *Short-term anti-plaque effect of chlorhexidine varnishes*. Journal of Clin Periodontol 2005; 32:899-904
- Crea, A. *Treatment of Intrabony Defects Using Guided Tissue Regeneration or Enamel Matriz Derivative: A 3-Year Prospective Randomized Clinical Study*. J Periodontol 2008;79:2281-2289.
- de Albuquerque, R.et al. *Reduction of salivary S aureus and mutans group streptococci by a procedural chlorhexidine rinsa and maximal inhibitory dilutions of chlorhexidine and cetylpyridinum*. Quintessence Int, 2004;35:635-640
- De Sanctis M., Zucchelli G., Clauser C. *Bacterial colonization of barrier material and periodontal regeneration*. J Clin Periodontol, 1996. 23(11): p. 1039-46.
- De Sanctis, M. *Bacterial colonization of bioabsorbable barrier material and periodontal regeneration*. J Periodontol, 1996. 67(11): p. 1193-200.
- Elharar F., Rodríguez H.J., Benqué E.P., Caffesse R.G. *Guided tissue regeneration with bioabsorbable and expanded polytetrafluoroethylene barrier membranes in the treatment of naturally occurring periodontal defects in dogs*. J. Periodontol 1998;69:1218-122

- Fine H.D., Furgang D. *Effect of an essential oil-containing antiseptic mouthrinse on plaque and salivary Streptococcus mutans levels.* Journal of Clin Periodontol 2000; 27: 157
- Frandsen EV, Sander L, Arnbjerg D, Theilade E. *Effect of local metronidazole application on periodontal healing following guided tissue regeneration. Microbiological findings.* J Periodontol, 1994. 65(10): p. 921-8.
- Goodson, J. *Periodontal disease treatment by local drug delivery.* J Periodontol, 1985. 56(5): p. 265-72.
- Gotfredsen K, Nimb L, Hjorting-Hansen E. *Immediate placement using a biodegradable barrier, polyhydroxybutyrate-hydroxyvalerate reinforced with polyglactin 910. An experimental study in dogs.* Clin Oral Impl Res 1994; 5: 3-91.
- Gottlow J, Laurell L, Lundgren D. *Periodontal tissue response to a new bioresorbable guided tissue regeneration device: a longitudinal study in monkeys.* Int J Periodont Rest Dent 1994; 14: 437-449
- Gottlow J., Nyman S., Karring T. & Lindhe J. *New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration.* J Clin Periodontol 1984; 11: 494-503.
- Gottlow J., Nyman S., Lindhe J., Karring T. & Wennström J. *New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. Case reports.* J Clin Periodontol 1986; 13: 604-616.
- Gottlow, J. *Maintenance of new attachment gained through guided tissue regeneration.* J Clin Periodontol, 1992. 19(5): p. 315-7
- Gottlow, J. *New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. Case reports.* J Clin Periodontol, 1986. 13(6): p. 604-16.
- Gottlow, J., *Guided tissue regeneration using bioresorbable and non-resorbable devices: initial healing and long-term results.* J Periodontol, 1993. 64(11 Suppl): p. 1157-65.
- Greenstein G., Caton J.G. *Biodegradable barriers and guided tissue regeneration.* Periodontology 2000, 1993; 1:36-45
- Grenier, D., *Effect of chlorhexidine on the adherence properties of Porphyromonas gingivalis.* J Clin Periodontol, 1996. 23(2): p. 140-2.

- Grevstad H. J., Leknes K. N. *Ultrastructure of plaque associated with polytetrafluoroethylene (PTFE) membranes used for guided tissue regeneration.* Journal of Clin Periodontol 1993; 20: 193-198
- Hämmerle, C.H.; Lung, R.E. *Bone augmentation by means of barrier membranes.* Periodontology 2000; 2003 (33): 36-53
- Hardwick, R. *Devices for dentoalveolar regeneration: an up-to-date literature review.* J Periodontol, 1995. 66(6): p. 495-505.
- Hung SL, Lin YW, Wang YH, Chen YT, Su CY, Ling LJ. *Permeability of Streptococcus mutans and Actinobacillus actinomycetemcomitans Through guided tissue regeneration membranes and their effects on attachment of periodontal ligament cells.* J Periodontol, 2002. 73(8): p. 843-51.
- Hung SL, Lin YW, Chen YT, Ling LJ. *Attachment of periodontal ligament cells onto various antibiotic-loaded GTR membranes.* Int J Periodontics Restorative Dent, 2005; 25(3):265-75.
- John G, Becker J, Schwarz F. *Effects of taurolidine and chlorhexidine on SaOS-2 cells and human gingival fibroblasts grown on implant surfaces.* Journal of Oral and Maxillofacial Implants, 2014;29(3):728-734
- Jones C. G. *Chlorhexidine: is it still the gold standard?* Periodontology 2000, 1997; 15:55-62.
- Karring, T. *Development of the biological concept of guided tissue regeneration--animal and human studies.* Periodontol 2000, 1993. 1(1): p. 26-35
- Kebschull M., Papapanou P.N. *Periodontal microbial complexes associated with specific cell and tissue responses.* Journal of Clin Periodontol 2011;38(Suppl 11): 17-27
- Koichi, I. *Effects of Bioabsorbable and non Resorbable Barrier Membranes on Bone Augmentation in Rabbit Calvaria.* J. Periodontol 1998;69:1229-1237.
- Kurtiş B, Unsal B, Cetiner D, Gültekin E, Ozcan G, Celebi N, Ocak O. *Effect of polylactide/glycolide (PLGA) membranes loaded with metronidazole on periodontal regeneration following guided tissue regeneration in dogs.* J Periodontol, 2002. 73(7): p. 694-700.
- Laurell, L. *Clinical Use of a Bioresorbable Matrix Barrier in Guided Tissue Regeneration Therapy. Case Series.* J Periodontol 1994; 65:967-975.

- Lin S., et al. *In vitro antibacterial efficacy of a new chlorhexidine slow-release device*. Quintessence Int, 2006;37:391-394
- Ling, L. *Response of Regenerative Tissues to Plaque: A Histological Study in Monkeys**. J Periodontol 1994; 65:781-787
- Ling, L. *The influence of membrane exposure on the outcomes of guided tissue regeneration: clinical and microbiological aspects*. J Periodontal Res, 2003. 38(1): p. 57-63.
- Loesche W. J.; Grossmann N and Giordano J. *Metronidazole in periodontitis. The effect of patient compliance on treatment parameters*. Journal of Clinical Periodontol 1993; 20: 96-104.
- López, N. *Effects of Metronidazole Plus Amoxicillin in Progressive Untreated Adult Periodontitis: Results of a Single 1-Week Course after 2 and 4 Months**. J Periodontol 1998;69:1291-1298.
- Lundgren D, Sennerby L, Falk. *The use of a new bioresorbable barrier for guided bone regeneration in connection with implant installation. Case report*. Clin Oral Imp Res 1994; 5: 177-84.
- Lyons LC, Weltman RL, Moretti AJ, Trejo PM. *Regeneration of degree II furcation defects with a 4% doxycycline hyclate bioabsorbable barrier*. J Periodontol, 2008; 79(1):72-9
- MacDonald, E.S. *Clinical and Microbiological Evaluation of a Bioabsorbable and a Nonresorbable Barrier Membrane in the Treatment of Periodontal Intraosseous Lesions*. J Periodontol 1998;69:445-453
- Machtei, E. *Clinical, microbiological, and histological factors which influence the success of regenerative periodontal therapy*. J Periodontol, 1994. 65(2): p. 154-61.
- Machtei EE, Oettinger-Barak O, Peled M. *Guided tissue regeneration in smokers: effect of aggressive anti-infective therapy in Class II furcation defects*. J Periodontol, 2003; 74(5):579-84
- Magnusson, I. *New attachment formation following controlled tissue regeneration using biodegradable membranes*. J Periodontol, 1988. 59(1): p. 1-6.
- Mariotti A.j, Rumpf D. *Chlorhexidine-induced changes to human gingival fibroblast collagen and non-collagen protein production*. J Periodontol 1999;70:1443-1448.

Markman C, Fracalanza SE, Novaes AB Jr, Novaes AB. *Slow release of tetracycline hydrochloride from a cellulose membrane used in guided tissue regeneration*. J Periodontol, 1995; 66(11):978-83.

Marsh P.D. *Dental plaque biological significance of a biofilm and community life-style*. Journal of Clin Periodontol 2005; 32 (Suppl): 7-15.

Martínez-Hernández M, Olivares-Navarrete R, Almaguer-Flores A. *Influence of the periodontal status on the initial biofilm formation on titanium surfaces*. Clin Implant Dent and Related Research, 2016;18:174-181

Mayfield L. Söderholm G. *Guided tissue regeneration for the treatment of infraosseous defects using a bioabsorbable membrane. A controlled clinical study*. Journal of Clin Periodontol 1998; 25: 585-595

Melcher, A.H. *On the repair potential of periodontal tissues*. J Periodontol, 1976. 47(5): p. 256-60.

Mestnik M.J., Feres M., Figueiredo L. *Short - term benefits of the adjunctive use of metronidazole plus amoxicilin in the microbial profile and in the clinical parameters of subjects with generalized aggressive periodontitis*. Journal of Clin Periodontol 2010; 37:353-365.

Mitchell D.A., *Metronidazole: its use in clinical dentistry*. J Clin Periodontol. 1984; 11: 145-158.

Mombelli A., Decaillet F. *The characteristics of biofilms in periimplant disease*. Journal of Clin Periodontol 2011;38:(Suppl 11):203-213.

Mombelli, A. *Isolation of periodontal species after guided tissue regeneration*. J Periodontol, 1993. 64(11 Suppl): p. 1171-5.

Needleman, I. *Guided tissue regeneration for periodontal intrabony defects--a Cochrane Systematic Review*. Periodontol 2000, 2005. 37: p. 106-23.

Newman, M. *The role of infection and anti-infection treatment in regenerative therapy*. J Periodontol, 1993. 64(11 Suppl): p. 1166-70.

Nowzari H., Slots J. *Microorganisms in polytetrafluoroethylene barrier membranes for guided tissue regeneration*. Journal of Clin Periodontol 1994; 21: 203-210

Nowzari, H. *The dynamics of microbial colonization of barrier membranes for guided tissue regeneration*. J Periodontol, 1996; 67(7):694-702

- Newsari H., Matian F., Slots J. *Periodontal pathogens on polytetrafluoroethylene membrane for guided tissue regeneration inhibit healing.* J Clin Periodontol, 1995; 22(6):469-74
- Nyman S., Gottlow J., Karring T., Lindhe J. *The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey.* J Clin Periodontol 1982; 9:257-265.
- Nyman S., Gottlow J., Karring T., Rylander H. *New attachment following surgical treatment of human periodontal disease.* J Clin Periodontol 1982; 9:290-296.
- Nyman, S. *New attachment formation by guided tissue regeneration.* J Periodontal Res, 1987. 22(3): p. 252-4.
- Ortiz Sánchez BJ, Villavicencio Pérez J, Garzón Trinidad JA. *Colonización de membranas de PTFE-e en regeneración tisular guiada.* Revista ADM 2006; LXIII:135-141.
- Piattelli, A. *Cellular colonization and bone formation into expanded polytetrafluoroethylene membranes: A light microscopical and histochemical time course study in the rabbit.* J Periodontol 1996;67:720-725.
- Pontoriero R., Lindhe J., Nyman S., Karring T. *Guided tissue regeneration in degree II furcation involved mandibular molars. A clinical study.* J Clin Periodontol 1988; 15: 247-254
- Pontoriero R., Lindhe J., Nyman S., Karring T. *Guided tissue regeneration in the treatment of furcation defects in mandibular molars. A clinical study of degree II involvements.* Journal of Clinical Periodontol 1989; 16: 170-174.
- Position Paper. *The Potential Role of Growth and Differentiation Factors in Periodontal Regeneration.* J Periodontol 1996;67:545-553.
- Quirynen M., Gizani S. *The effect of periodontal therapy on the number of cariogenic bacteria in different intraoral niches.* Journal of Clin Periodontol 1999; 26: 322-327
- Quirynen, M. *Topical antiseptics and antibiotics in the initial therapy of chronic adult periodontitis: microbiological aspects.* Periodontol 2000, 2002. 28: p. 72-90.
- Ricci, G. *In vitro permeability evaluation and colonization of membranes for periodontal regeneration by Porphyromonas gingivalis.* J Periodontol, 1996; 67(5):490-6.

- Rocchietta I, Simion M, Hoffmann M, Trisciuglio D, Benigni M, Dahlin C. *Vertical bone augmentation with an autogenous block or particles in combination with guided bone regeneration. A clinical and histological preliminary study in humans.* Clin Implant Dent and Related Research, 2016;18(1): 19-29
- Rylev M., Kilian M. *Prevalence and distribution of principal periodontal pathogens worldwide.* Journal of Clin Periodontol 2008; 35:(Suppl 8): 346-361.
- Sandenberg E, Dahlin C, Linde A. *Bone regeneration by osteopromotion technique using bioabsorbable membranes. An experimental study in rats.* J Oral Maxillofac Surg 1993; 51: 1106-1114
- Sander C., Karring T. *New attachment and bone formation in periodontal defects following treatment of submerged roots with guided tissue regeneration.* Journal of Clin Periodontol 1995; 22: 295-299.
- Sander, L. *Effect of local metronidazole application on periodontal healing following guided tissue regeneration. Clinical findings.* J Periodontol, 1994. 65(10): p. 914-20
- Sanz M, Jepsen K, Eickholz P, Jepsen S. *Clinical concepts for regenerative therapy in furcations.* Periodontology 2000, 2015;68:308-332
- Schenk K. *Levels of salivary IgA antibodies reactive with bacteria from dental plaque are associated with susceptibility to experimental gingivitis.* Journal of Clin Periodontol 1993;20: 411-417
- Schmalz, C. *Periodontal Regeneration of Intrabony Defects With Resorbable and Non-Resorbable Membranes: 30-Month Results.* J Clin Periodontol 1997; 24:17-27.
- Sculean A, Nikolidakis D, Schwarz F. *Regeneration of Periodontal Tissues: combinations of barrier membranes and grafting materials - biological foundation and preclinical evidence. A systematic review.* J Clin Periodontol 2008; 35(Suppl. 8):106-116
- Sculean, A. *Treatment of intrabony defects with enamel matrix proteins and guided tissue regeneration. A prospective controlled clinical study.* J Clin Periodontol, 2001. 28(5): p. 397-403.
- Sela, M. *Enzymatic degradation of collagen-guided tissue regeneration membranes by periodontal bacteria.* Clin Oral Implants Res, 2003. 14(3): p. 263-8.

Shibly O., Rifai S. *Supragingival dental plaque in the etiology of oral diseases*. Periodontology 2000, 1995; 8: 42-59

Simion, M. *A preliminary report on a method for studying the permeability of expanded polytetrafluoroethylene membrane to bacteria in vitro: a scanning electron microscopic and histological study*. J Periodontol, 1994;65(8):755-61.

Sipos PM, Loos BG, Abbas F, Timmerman MF, van der Velden U. *The combined use of enamel matrix proteins and a tetracycline-coated expanded polytetrafluoroethylene barrier membrane in the treatment of intraosseous defects*. J Clin Periodontol, 2005;32(7):765-72.

Slots J., MacDonald E.S. *Infectious aspects of periodontal regeneration*. Periodontology 2000, 1999; 19:164-172

Somayaji, B.V. *Evaluation of antimicrobial efficacy and release pattern of tetracycline and metronidazole using a local delivery system*. J. Periodontol 1998;69:409-413

Sridhar S, Wilson TG, Palmer KL, Valderrama P, Mathew MT, Prasad S, Jacob SM. *In vitro investigation of the effect of oral bacteria in the surface oxidation of dental implants*. Clin Implant Dent and Related Research, 2015; 17(Suppl 2):562-565

Stoltze, K. *Systemic absorption of metronidazole after application of a metronidazole 25% dental gel*. J Clin Periodontol, 1992. 19(9 Pt 2): p. 693-7.

Takata, T. *Attachment, proliferation and differentiation of periodontal ligament cells on various guided tissue regeneration membranes*. J Periodontal Res, 2001;36(5):322-7.

Tempro, PJ. *Colonization of retrieved polytetrafluoroethylene membranes: morphological and microbiological observations*. J Periodontol, 1993; 64(3):162-8.

Tribble G.D., Lamont R.J. *Bacterial invasion of epithelial cells and spreading in periodontal tissue*. Periodontology 2000, 2010; 52:68-83

van der Reijden W. A. *Mutans Streptococci in subgingival plaque of treated and untreated patients with periodontitis*. Journal of Clin Periodontol 2001; 28: 686-691.

van Winkelhoff, A. *Antibiotics in periodontics: right or wrong?* J Periodontol, 2009. 80(10): p. 1555-8.

Wang HL, Yuan K, Burgett F, Shyr Y, Syed S. *Adherence of oral microorganisms to guided tissue membranes: an in vitro study*. J Periodontol, 1994. 65(3): p. 211-8.

- Yoshinari N, Tohya T, Kawase H, Matsuoka M, Nakane M, Kawachi M, Mitani A, Koide M, Inagaki K, Fukuda M, Noguchi T. *Effect of repeated local minocycline administration on periodontal healing following guided tissue regeneration.* J Periodontol, 2001; 72(3):284-95.
- Yoshinari N, Tohya T, Mori A, Koide M, Kawase H, Takada T, Inagaki K, Noguchi T. *Inflammatory cell population and bacterial contamination of membranes used for guided tissue regenerative procedures.* J Periodontol, 1998; 69(4):460-9.
- Zahedi, S. *Evaluation of a Diphenylphosphorylazide-Crosslinked Collagen Membrane for Guided Bone Regeneration in Mandibular Defects in Rats.* J Periodontol 1998;69:1238-1246.
- Zarkesh N. *Tetracycline-coated polytetrafluoroethylene barrier membranes in the treatment of intraosseous periodontal lesions.* J Periodontol, 1999; 70(9):1008-16
- Zitzmann N.M., Scharer P. *Factors influencing the success of guided bone regeneration. Smoking, timing of implant placement, implant location, bone quality and provisional restoration.* Journal of Clin Periodontol 1999; 26: 673-682
- Zucchelli G., Cesari C., Clauser C., DeSanctis M. *Early bacterial accumulation on guided tissue regeneration membrane materials. An in vivo study.* J Periodontol, 1998; 69(11):1193-202
- Zucchelli G, Sforza NM, Clauser C, Cesari C, De Sanctis M. *Topical and systemic antimicrobial therapy in guided tissue regeneration.* J Periodontol, 1999. 70(3): p. 239-47

ANEXOS

Hojas de Captura de datos:

Streptococcus mutans

No. de muestra	Membrana	Tiempo de medición	Halo inhibitorio (mm)
1	Colágeno	24 hrs	0
		48 hrs	0
		7 días	0
	Clorhexidina	24 hrs	23
		48 hrs	23
		7 días	23
	Metronidazol	24 hrs	22
		48 hrs	22
		7 días	22
2	Colágeno	24 hrs	0
		48 hrs	0
		7 días	0
	Clorhexidina	24 hrs	21
		48 hrs	21
		7 días	21
	Metronidazol	24 hrs	26
		48 hrs	24
		7 días	24
3	Colágeno	24 hrs	0
		48 hrs	0
		7 días	0
	Clorhexidina	24 hrs	26
		48 hrs	26
		7 días	26
	Metronidazol	24 hrs	0 (no hubo crec)
		48 hrs	0
		7 días	0
4	Colágeno	24 hrs	0
		48 hrs	0
		7 días	0
	Clorhexidina	24 hrs	23
		48 hrs	23

	Metronidazol	7 días	23
		24 hrs	24
		48 hrs	22
		7 días	22
5	Colágeno	24 hrs	0
		48 hrs	0
		7 días	0
	Clorhexidina	24 hrs	22
		48 hrs	22
		7 días	22
	Metronidazol	24 hrs	25
		48 hrs	24
		7 días	24
6	Colágeno	24 hrs	0
		48 hrs	0
		7 días	0
	Clorhexidina	24 hrs	18
		48 hrs	18
		7 días	18
	Metronidazol	24 hrs	0 no hubo crec
		48 hrs	0
		7 días	0
7	Colágeno	24 hrs	0
		48 hrs	0
		7 días	0
	Clorhexidina	24 hrs	23
		48 hrs	23
		7 días	23
	Metronidazol	24 hrs	23
		48 hrs	21
		7 días	21
8	Colágeno	24 hrs	0
		48 hrs	0
		7 días	0
	Clorhexidina	24 hrs	0 no hubo crec
		48 hrs	0
		7 días	0
	Metronidazol	24 hrs	0
		48 hrs	0
		7 días	0
	Colágeno	24 hrs	0
		48 hrs	0
		7 días	0
		24 hrs	23

9	Clorhexidina	48 hrs	22
		7 días	22
	Metronidazol	24 hrs	29
		48 hrs	29
		7 días	29
10	Colágeno	24 hrs	0
		48 hrs	0
		7 días	0
	Clorhexidina	24 hrs	22
		48 hrs	22
		7 días	22
	Metronidazol	24 hrs	25
		48 hrs	25
		7 días	24
11	Colágeno	24 hrs	0
		48 hrs	0
		7 días	0
	Clorhexidina	24 hrs	22
		48 hrs	22
		7 días	22
	Metronidazol	24 hrs	23
		48 hrs	23
		7 días	23
12	Colágeno	24 hrs	0
		48 hrs	0
		7 días	0
	Clorhexidina	24 hrs	23
		48 hrs	23
		7 días	23
	Metronidazol	24 hrs	24
		48 hrs	23
		7 días	23
13	Colágeno	24 hrs	0
		48 hrs	0
		7 días	0
	Clorhexidina	24 hrs	23
		48 hrs	22
		7 días	22
	Metronidazol	24 hrs	24
		48 hrs	24
		7 días	24
	Colágeno	24 hrs	0
		48 hrs	0
		7 días	0

14	Clorhexidina	24 hrs	23
		48 hrs	23
		7 días	23
	Metronidazol	24 hrs	21
		48 hrs	21
		7 días	21
15	Colágeno	24 hrs	0
		48 hrs	0
		7 días	0
	Clorhexidina	24 hrs	23
		48 hrs	23
		7 días	23
	Metronidazol	24 hrs	21
		48 hrs	21
		7 días	21
16	Colágeno	24 hrs	0
		48 hrs	0
		7 días	0
	Clorhexidina	24 hrs	22
		48 hrs	22
		7 días	22
	Metronidazol	24 hrs	26
		48 hrs	25
		7 días	25
17	Colágeno	24 hrs	0
		48 hrs	0
		7 días	0
	Clorhexidina	24 hrs	21
		48 hrs	21
		7 días	21
	Metronidazol	24 hrs	14
		48 hrs	12
		7 días	12
18	Colágeno	24 hrs	0
		48 hrs	0
		7 días	0
	Clorhexidina	24 hrs	22
		48 hrs	22
		7 días	22
	Metronidazol	24 hrs	25
		48 hrs	25
		7 días	24
	Colágeno	24 hrs	0
		48 hrs	0

19		7 días	0
		24 hrs	23
		48 hrs	23
	Clorhexidina	7 días	23
		24 hrs	22
		48 hrs	22
20	Metronidazol	7 días	22
		24 hrs	0
		48 hrs	0
	Colágeno	7 días	0
		24 hrs	23
		48 hrs	23
	Clorhexidina	7 días	23
		24 hrs	20
		48 hrs	20
21	Metronidazol	7 días	20
		24 hrs	0
		48 hrs	0
	Colágeno	7 días	0
		24 hrs	23
		48 hrs	23
	Clorhexidina	7 días	23
		24 hrs	25
		48 hrs	25
22	Metronidazol	7 días	25
		24 hrs	0
		48 hrs	0
	Colágeno	7 días	0
		24 hrs	23
		48 hrs	22
	Clorhexidina	7 días	22
		24 hrs	22
		48 hrs	22
23	Metronidazol	7 días	22
		24 hrs	0
		48 hrs	0
	Colágeno	7 días	0
		24 hrs	25
		48 hrs	25
	Clorhexidina	7 días	25
		24 hrs	23
		48 hrs	22

Streptococcus sanguinis

No. de Muestra	Membrana	Tiempo de medición	Halo inhibitorio (mm)
1	Colágeno	24 hrs	0
		48 hrs	0
		7 días	0
	Clorhexidina	24 hrs	15.5
		48 hrs	14.5
		7 días	14
	Metronidazol	24 hrs	7.5
		48 hrs	7.5
		7 días	7
2	Colágeno	24 hrs	0
		48 hrs	0
		7 días	0
	Clorhexidina	24 hrs	15
		48 hrs	15
		7 días	14
	Metronidazol	24 hrs	7.5
		48 hrs	7
		7 días	6.5
3	Colágeno	24 hrs	0
		48 hrs	0
		7 días	0
	Clorhexidina	24 hrs	15
		48 hrs	15
		7 días	13
	Metronidazol	24 hrs	7
		48 hrs	7
		7 días	7
4	Colágeno	24 hrs	0
		48 hrs	0
		7 días	0
	Clorhexidina	24 hrs	15
		48 hrs	14.5
		7 días	14
	Metronidazol	24 hrs	7.5
		48 hrs	7.5
		7 días	7
	Colágeno	24 hrs	0
		48 hrs	0

5		7 días	0
		24 hrs	14
		48 hrs	13
	Clorhexidina	7 días	13
		24 hrs	7
		48 hrs	7
		7 días	6.5
6	Metronidazol	24 hrs	7
		48 hrs	7
		7 días	6.5
	Colágeno	24 hrs	0
		48 hrs	0
		7 días	0
	Clorhexidina	24 hrs	14
		48 hrs	14
		7 días	14
7	Metronidazol	24 hrs	7.0
		48 hrs	7.0
		7 días	6.5
	Colágeno	24 hrs	0
		48 hrs	0
		7 días	0
	Clorhexidina	24 hrs	15.5
		48 hrs	15
		7 días	15
8	Metronidazol	24 hrs	7
		48 hrs	7
		7 días	6.5
	Colágeno	24 hrs	0
		48 hrs	0
		7 días	0
	Clorhexidina	24 hrs	15
		48 hrs	15
		7 días	14
9	Metronidazol	24 hrs	7
		48 hrs	7
		7 días	7
	Colágeno	24 hrs	0
		48 hrs	0
		7 días	0
	Clorhexidina	24 hrs	14
		48 hrs	14
		7 días	13
	Metronidazol	24 hrs	7
		48 hrs	6.5
		7 días	6.5

10	Colágeno	24 hrs	0
		48 hrs	0
		7 días	0
	Clorhexidina	24 hrs	14
		48 hrs	14
		7 días	13
	Metronidazol	24 hrs	7
		48 hrs	7
		7 días	7
11	Colágeno	24 hrs	0
		48 hrs	0
		7 días	0
	Clorhexidina	24 hrs	14.5
		48 hrs	14
		7 días	14
	Metronidazol	24 hrs	7
		48 hrs	7
		7 días	7
12	Colágeno	24 hrs	0
		48 hrs	0
		7 días	0
	Clorhexidina	24 hrs	13
		48 hrs	contam
		7 días	
	Metronidazol	24 hrs	7
		48 hrs	contam
		7 días	
13	Colágeno	24 hrs	no hubo crec
		48 hrs	0
		7 días	0
	Clorhexidina	24 hrs	No hubo crec
		48 hrs	
		7 días	
	Metronidazol	24 hrs	No hubo crec
		48 hrs	
		7 días	
14	Colágeno	24 hrs	0
		48 hrs	0
		7 días	0
	Clorhexidina	24 hrs	13
		48 hrs	13
		7 días	12.5
	Metronidazol	24 hrs	7
		48 hrs	7

		7 días	6.5
15	Colágeno	24 hrs	0
		48 hrs	0
		7 días	0
	Clorhexidina	24 hrs	14.5
		48 hrs	14
		7 días	14
	Metronidazol	24 hrs	6.5
		48 hrs	6.5
		7 días	6.5
16	Colágeno	24 hrs	0
		48 hrs	0
		7 días	0
	Clorhexidina	24 hrs	14.5
		48 hrs	14.5
		7 días	14.5
	Metronidazol	24 hrs	7.5
		48 hrs	7.5
		7 días	7
17	Colágeno	24 hrs	0
		48 hrs	0
		7 días	0
	Clorhexidina	24 hrs	13.5
		48 hrs	13
		7 días	12
	Metronidazol	24 hrs	8
		48 hrs	7
		7 días	6
18	Colágeno	24 hrs	0
		48 hrs	0
		7 días	0
	Clorhexidina	24 hrs	No hubo crecimiento
		48 hrs	
		7 días	
	Metronidazol	24 hrs	
		48 hrs	
		7 días	
19	Colágeno	24 hrs	0
		48 hrs	0
		7 días	0
	Clorhexidina	24 hrs	14
		48 hrs	13
		7 días	13
		24 hrs	7

20	Metronidazol	48 hrs	7
		7 días	7
	Colágeno	24 hrs	0
		48 hrs	0
		7 días	0
	Clorhexidina	24 hrs	14
		48 hrs	14
		7 días	12.5
	Metronidazol	24 hrs	7
		48 hrs	6.5
		7 días	6.5

21	Colágeno	24 hrs	0
		48 hrs	0
		7 días	0
	Clorhexidina	24 hrs	16
		48 hrs	13
		7 días	13.5
	Metronidazol	24 hrs	8
		48 hrs	7.5
		7 días	7
22	Colágeno	24 hrs	0
		48 hrs	0
		7 días	0
	Clorhexidina	24 hrs	15
		48 hrs	15
		7 días	14
	Metronidazol	24 hrs	7.5
		48 hrs	7.5
		7 días	6.5
23	Colágeno	24 hrs	0
		48 hrs	0
		7 días	0
	Clorhexidina	24 hrs	19
		48 hrs	15
		7 días	14
	Metronidazol	24 hrs	9
		48 hrs	8
		7 días	6.5
24	Colágeno	24 hrs	0
		48 hrs	0
		7 días	0
	Clorhexidina	24 hrs	19
		48 hrs	16
		7 días	14.5

	Metronidazol	24 hrs	8
		48 hrs	7
		7 días	7

RESUMEN BIOGRÁFICO

MARIZA LARA LEMINI

Candidato para el Grado de

Maestra en Ciencias Odontológicas con Especialidad en Periodoncia

Tesis: EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LAS PROPIEDADES
ANTIBACTERIANAS DE MATERIALES EMPLEADOS PARA
REGENERACIÓN TISULAR

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacido en Puebla, Puebla, México el 13 de Julio de 1982, hijo de Armando Francisco Javier Lara Rosano y Elvira Mariza Lemini Borzani.

Educación: Egresado de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, grado obtenido Licenciada en Estomatología en 2006, segundo lugar en la generación.

Experiencia Profesional: Maestro por Asignatura de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla desde 2011, practica privada desde el año 2010.